Mariana Cardillo Theobaldo

Efeitos da solução salina hipertônica na resposta inflamatória na sepse

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos inflamatórios e alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo

2012

Mariana Cardillo Theobaldo

Efeitos da solução salina hipertônica na resposta inflamatória na sepse

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos inflamatórios e alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Theobaldo, Mariana Cardillo
Efeitos da solução salina hipertônica na resposta inflamatória na sepse / Mariana Cardillo Theobaldo. -- São Paulo, 2012.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.
Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Sepse 2.Solução salina hipertônica 3.Inflamação 4.Infiltração de neutrófilos 5.Estresse oxidativo.

USP/FM/DBD-167/12

Dedicatória

À minha família que sempre apoiou minhas

decisões, me deram a base necessária

para me tornar quem sou hoje.

Em especial a minha filha, Fernanda que amo muito.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano, por me aceitar como aluna, pela orientação, apoio, disponibilidade, compreensão, respeito e dedicação, que foram necessários para realizar esta tese.

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco, pela oportunidade de realizar esta tese no LIM 51, pela confiança e apoio.

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, pela oportunidade, atenção, respeito e apoio.

À Kelli Gouveia, Suely A. Kubo, Denise F. Barbeiro, Hermes V. Barbeiro, Fátima Abatepaulo, Geraldo e Thais Lima, pelo apoio, colaboração e amizade, os quais ajudaram direta ou indiretamente na realização desta tese.

Aos meus pais, Francesca Cardillo Theobaldo e Frederico J. F. Theobaldo, e ao meu irmão Arthur Cardillo Theobaldo que sempre me apoiaram durante a minha vida e me deram todo o suporte necessário durante estes 4 anos de doutorado.

A minha querida filha, Fernanda Theobaldo, que mesmo indiretamente me ajudou durante este projeto, com carinho, amor e paciência, que consegue tornar a minha vida muito mais alegre.

À Flávia Llimona, pela alegria e colaboração na realização desta tese, assim como pela amizade e apoio em momentos importantes e pessoais da minha vida. Agradeço também a sua família pelo apoio.

À Nadine, Rossana, Gabriela, Camila, Marisa, Fernanda, Priscila, Viviane, Paola, Luciana, Sátya e Carolina, amigas queridas que ajudaram durante o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, e compreensão em muitos momentos difíceis.

À Mariana, Nadine, Paulle, Paloma, Ariadne, Simone e Igor Silva, pela ajuda, apoio, sinceridade, amizade, e muitos momentos que compartilhamos desde pequenos e durante este trabalho.

Aos amigos Viviam, Ricardo e Ester pela ajuda, colaboração, e muitas risadas, que me ajudaram a superar muitas etapas deste trabalho, principalmente nos momentos mais complicados deste projeto.

Você tem que estar preparado para se queimar em sua própria chama: como se renovar sem primeiro se tornar cinzas?

- Assim falou Zaratustra (Friedrich Nietzsche)

A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.

Charles Chaplin

Sumário

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 Sepse 1

1.2 Recrutamento de neutrófilos na resposta inflamatória 6

1.3 Perfil de citocinas na sepse 10

1.4 Estresse oxidativo 14

1.5 Solução salina hipertônica 16

2 OBJETIVOS 19

2.1 Objetivo Geral 19

2.2 Objetivos Específicos 19

3 METODOLOGIA 22

3.1 Animais 22

3.2 Anestésico 22

3.3 Modelo experimental de sepse polimicrobiana 22

3.4 Reposição volêmica 23

3.5 Grupos (in vivo) 23

3.6 Taxa de sobrevida 23

3.7 Protocolo de estudo 24

3.8 Preparo das amostras para dosagem de proteínas no pulmão e intestino 25

3.9 Quantificações de proteína 25

3.10 Infiltração de neutrófilos pelo método de quantificação de mieloperoxidade 25
3.11 Quantificação de mediadores inflamatórios 26
3.12 Imunohistoquímica 28
3.13 Quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico 29
3.14 Dosagem de Nitrito 30
3.15 Contagem diferencial de células 30
3.16 Análise Estatística 31
4 RESULTADOS 32
4.1 Taxa de Sobrevida 32
4.2 Resposta inflamatória na Cavidade abdominal 33
4.2.1 Intestino 33
4.2.2 Lavado peritoneal 44
4.3 Resposta inflamatória no pulmão 46
5 DISCUSSÃO 58
5.1 Resposta inflamatória na cavidade abdominal 60
5.2 Resposta inflamatória no pulmão 63
6 CONCLUSÃO 69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

LISTA DE ABREVIATURA, SIMBOLOS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
BASES	do inglês “Brazilian Sepsis Epidemological Study” traduzido como estudo epidemiológico de sepsis no Brasil.
BSA	Albumina de soro bovino
CARS	do inglês “compensatory antinflammatory response síndrome” traduzido como síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória
CD14	Proteína de membrana ancorada ao glycosyl-phosphatidylinositol
CLP	do inglês “Cecal Ligation and puncture” traduzido como ligadura e perfuração cecal
COX	Cicloxigenase
COX-2	Cicloxigenase 2
CXCR2	Receptor de quimiocinas CXC 2
CXCR4	Receptor de quimiocinas CXC 4
DMSO	Di-metil sulfóxido
EDTA	do inglês “Ethylenediamine-tetra acetic acid”
ELISA	do ingles “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”

eNOS	do inglês "*endothelial nitric oxide synthase"* traduzido como Óxido nítrico sintase endotelial
ERN	Espécies Reativas do Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
G-CSF	do inglês "*hematopoietic cytokine granulocyte colony-stimulating factor"* traduzido como fator estimulador de colônia de granulócitos
HCL	Ácido clorídrico
H_3PO_4	Ácido fosfórico
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
ICAM-1	do inglês *intercellular adhesion molecule 1* traduzido como Molécula de Adesão Intercelular 1
ICAM-2	do inglês *intercellular adhesion molecule 2* traduzido como Molécula de Adesão Intercelular 2
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IFN-γ	Interferon-γ
IκB	Inibidor de proteína κB

iNOS	do inglês "*inducible nitric oxide synthase"* traduzido como Óxido nítrico sintase induzida
KCl	Cloreto de Potássio
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
LBP	Proteína ligadora de LPS
LFA-1	do ingles "l*ymphocyte function – associated antigen-1"* também descrita como CD11a-CD18
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	ácido lipoteicóico
M	Molar
Mac-1	do inglês "*macrophage – antigen-1"* também descrita como CD11b-CD18
MD-2	Proteína acessória extra célula
MDA	Malondealdeído
MPO	Mieloperoxidase
mmHg	milímetros de mercúrio
MODS	do inglês "*multiple organ dysfunction syndrome"* traduzido como síndrome da falência múltipla de órgãos
mOsm/L	miliosmol por litro
N	Normal
NaCl	Cloreto de Sódio
Na_2HPO_4	Fosfato de Sódio monobásico anidro

NF-κB	Fator de transcrição nuclear B
NK	do inglês "*Natural Killer*"
nNOS	do inglês *"neuronal nitric oxide synthase*" traduzido como oxido nítrico sintase neuronal.
NO	do inglês "*nitric oxide"* traduzido como óxido nítrico
NO_2	Dióxido de nitrogênio
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
NOS	do inglês "*Nitric Oxide Sintase*" traduzido como óxido nítrico sintase
O_2^-	Anion superóxido
OH^-	Radical hidroxila
$ONOO^-$	Peroxinitrito
PAF	Fator ativador de plaqueta
PAMPs	do inglês "Pathogen-Associated Molecular Pattern" traduzido como Padrões moleculares associada ao patógeno
PG	Prostaglandina
PGE_2	Prostaglandina E2
pH	potencial hidrogeniônico
PBS	Tampão fosfato salina
rpm	Rotação por minuto

SDF-1	do inglês "*stromal cell derived factor* 1" traduzido como fator derivado de células estromais 1
SDS	do inglês "Sodium Dodecyl Sulfate"
SH	Solução salina hipertônica 7,5%
SIRS	do inglês "*systemic inflammatory response syndrome"* traduzido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SS	Solução salina isotônica 0,9%
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	do inglês "*thiobarbituric reactive substances"* traduzido como espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TLR	do inglês "*Toll like receptors*" traduzido como receptores do tipo toll like.
Tris	Tris-hidroxi-metil-aminometano
VCAM-1	do inglês *"vascular cell adhesion molecule 1" traduzido como* molécula de adesão vascular 1

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema representativo da metodologia utilizada 24

FIGURA 2 - Taxa de mortalidade 32

FIGURA 3 - Infiltrado de neutrófilos no intestino 34

FIGURA 4 - Marcação de ICAM-1 no intestino (6h) 36

FIGURA 5 - Marcação de ICAM-1 no intestino (12h) 37

FIGURA 6 - Marcação de ICAM-1 no intestino (24h) 38

FIGURA 7 – Concentração de quimiocina no intestino 39

FIGURA 8 - Perfil inflamatório no intestino 41

FIGURA 9 - Peroxidação lipídica no intestino 42

FIGURA 10 - Dosagem de Nitrito no intestino 43

FIGURA 11 – Infiltrado de neutrófilos no lavado peritoneal 45

FIGURA 12 - Infiltrado de neutrófilos no pulmão 47

FIGURA 13 - Marcação de ICAM-1 no pulmão (6h) 49

FIGURA 14 - Marcação de ICAM-1 no pulmão (12h) 50

FIGURA 15 - Marcação de ICAM-1 no pulmão (24h) 51

FIGURA 16 – Concentração de quimiocina no pulmão 53

FIGURA 17 - Perfil inflamatório no pulmão 55

FIGURA 18 - Peroxidação lipídica no pulmão 56

FIGURA 19 - Dosagem de Nitrito no pulmão 57

FIGURA 20 – Efeitos da SH na sepse polimicrobiana 67

Resumo

Sepse é a resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro à infecção, que pode ser desencadeada por bactérias, vírus ou fungos. Há aumento da produção de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas espécies reativas de oxigênio e do recrutamento de neutrófilos. A administração de solução salina hipertônica 7,5% (SH) acarreta na modulação da resposta inflamatória e hemodinâmica culminando na redução da morbidade e mortalidade em modelos de pancreatite e choque hemorrágico. No presente trabalho, estudamos os efeitos da SH na sepse, induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) em camundongos Balb/C, divididos em 3 grupos: CLP sem nenhum tratamento (CLP); CLP tratado com solução salina isotônica 0,9% (SS) e CLP tratado com SH 7,5% (SH); um quarto grupo foi utilizado como controle, no qual não foi induzido sepse ou administrado tratamento (C); ambos os tratamentos foram aplicados 30 min. após CLP. Lavado peritoneal, intestino e pulmão foram coletados após 6h, 12h e 24h para a análise de citocinas (TNF-α, IL-6 e IL-10), produção de oxido nítrico, peroxidação lipídica, infiltração de neutrófilos, moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) e quimiocinas (CXCL-1). O grupo SH mostrou aumento de sobrevida (60%) em comparação aos grupos SS (46,6%) e CLP (33,3%) após 168h. SS apresentou aumento na produção de TNF-α (27,3 ± 3,05 pg/ml) em 12h comparado ao grupo CLP (14,07 ± 1,68 pg/ml) e SH (19,66±3,19pg/ml); O efeito da SH na concentração de TNF permanece até 24h (6,2 ± 3,5 pg/ml *vs*. CLP 73,40± 49,52 pg/ml); a produção de IL-10 em 24h aumentaram nos grupos CLP (CLP - 3,12 ± 0,46 pg/ml) e SS (2,9 ± 0,9 pg/ml) em relação ao grupo SH (0,59 ± 0,34 pg/ml). Em 24h a produção de nitrito mostrou-se reduzida no grupo SH (6,77 ± 0,82 pg/ml) comparado com SS (10,65 ± 1,08 pg/ml), no pulmão. No intestino, a produção de nitrito, em 6h, diminuiu no grupo SH (1,27 ± 0,19 pg/ml) comparado com CLP (2,44 ± 0,51 pg/ml). No grupo SH houve redução do infiltrado de neutrófilos no pulmão em 24h, através da redução de moléculas de adesão e concentração de mieloperoxidase, em comparação com CLP (29,4 ± 5,7 ng/mg ; 3,02 ± 0,41 mU/mg). Nossos resultados indicam que SH modula a resposta inflamatória, além de melhorar a sobrevida de animais submetidos à sepse experimental.

Descritores: sepse, solução salina hipertônica, mediadores inflamatórios, infiltração de neutrófilos, estresse oxidativo.

Summary

Sepsis is a systemic inflammatory response to infection triggered by bacteria, virus and fungi. There is a rise in inflammatory mediators as citokynes, chemokynes, reactive oxygen species and neutrophil recruitment (1). The hypertonic saline solution (SH) has been showed to improve hemodynamic and inflammatory response. We studied the hypertonic solution effects in sepsis through cecal ligation and puncture (CLP) in mice Balb-C, divided in 3 groups: CLP without treatment (CLP); CLP treated with isotonic saline solution 0,9% - 34mg/Kg (SS); CLP treated with hypertonic saline solution 7,5% - 4ml/Kg (SH); and a 4th group indicating the basal values without both CLP and treatment (C); both treatments were administrated 30 min after CLP. The lung, gut and peritoneal fluid were collected after 6h, 12h and 24h to analyze cytokines levels, oxide nitric, lipid peroxidation and neutrophil infiltration. The SH group showed higher survival rats (60%) when compared to SS (46,6%) and CLP (33,3%) after 168h (7 days). TNF-α level in the SS group (27,3 ± 3,05 pg/ml) was increased at 12h when compared to CLP (14,07 ± 1,68 pg/ml) and SH (19,66±3,19pg/ml); and at 24h the SH (6,2 ± 3,5 pg/ml) decreased its level when compared to CLP (73,40± 49,52 pg/ml); IL-10 level at 24h was increased in CLP (CLP - 3,12 ± 0,46 pg/ml) and SS (2,9 ± 0,9 pg/ml) in relation to SH (0,59 ± 0,34 pg/ml). In 24h, the quantification of nitrite decreased in SH (6,77 ± 0,82 pg/ml) compared with SS (10,65 ± 1,08 pg/ml) in lung. In intestine, nitrite levels diminished in SH (1,27 ± 0,19 pg/ml) in relation to CLP (2,44 ± 0,51 pg/ml) in 6h. SH group reduced the neutrophil infiltration in lung, through adhesion molecule and myeloperoxidase at 24h (ng/mg;1,49 ± 0,24 mU/mg) in relation to CLP(29,4 ± 5,7 ng/mg ; 3,02 ± 0,41 mU/mg). Our results suggest that the volume replacement of both treatments modulate pro and anti-inflammatory mediators of an inflammatory response to infection, but hypertonic solution presented a more effective effect.

Descriptors: sepsis, hypertonic saline solution, inflammatory mediators, neutrophil infiltration, oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sepse

A palavra sepse, deriva do grego “σηψιζ” (sepo) e se refere à decomposição de animais, vegetais ou matéria orgânica, na presença de bactérias [1]. De Hippocrates e Galen a Lister, Flemming e Semmelweiss, foram descritas as primeiras teorias sobre a etiologia (patógenos microbiotas), patogênese (toxina e mediadores), e tratamento de sepse [2].

Hippocrates, cerca de 400 anos a.C, descrevia sepse como um declínio biológico perigoso que poderia ocorrer no organismo [2]. Caracterizada como um processo de colapso tecidual anormal que resultava da formação de pus com odor putrefato, e ocasionalmente, morte tecidual [3]. Galen, 1500 anos depois, foi o primeiro a descrever que feridas cicatrizavam como consequência do controle da infecção. Ele defendia que a formação de pus era crucial para cura de danos teciduais [2].

As primeiras teorias sobre doenças infecciosas, expostas por Hippocrates e Galen, se mantiveram incontestáveis por muitos anos, até que Lister, Koch e Pasteur, no início do século XIX, avançaram com as pesquisas. Seus estudos resultaram na mudança do paradigma para o modo como conhecemos hoje. Baseado nesses trabalhos, cientistas começaram a

desvendar os mistérios moleculares da sepse, o que permite um aperfeiçoamento no entendimento sobre a fisiopatologia da doença [2].

Em 1991, após uma conferência organizada pela ACCP/SCCM (American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine), sepse ficou definida como uma síndrome clínica, resultante da resposta inflamatória do hospedeiro a infecção [4]. A resposta inicial, apropriada, se torna amplificada envolvendo componentes da resposta humoral e celular [5]. Considera-se sepse grave um quadro de sepse acompanhada por uma disfunção orgânica e anormalidades de perfusão, como acidose láctica e alterações do nível de consciência, podendo também estar acompanhada por hipotensão (pressão sistólica < 90 mmHg ou redução de 40 mmHg dos valores basais), responsiva à hidratação vigorosa. Quando o choque séptico se instala, caracterizado como sepse com hipotensão irresponsiva à hidratação vigorosa e disfunção de órgãos [6], frequentemente ocorre uma evolução para síndrome da falência múltipla de órgãos (MODS) [7]. MODS é caracterizada pela presença de disfunção ou alteração da função de órgãos, no qual a homeostasia não pode ser mantida sem intervenção [4], levando o pacientes ao óbito.

Dados da literatura mundial apontam que sepse está associada à alta taxa de mortalidade, sendo na sepse de 10% a 36%, na sepse grave de 18% a 52% e no choque séptico de 46% a 82% [8]. No Brasil, dados do estudo BASES (Brazilian Sepsis Epidemological Study) mostram que sepse apresenta aproximadamente 34% de mortalidade, sepse grave 47% e choque séptico 52%. Essa doença também está associada a altos custos

nos setores privado e público, pois envolvem a utilização de equipamentos sofisticados e medicamentos caros. Outro fator importante é o intenso trabalho multiprofissional de enfermeiros, fisioterapeutas, farmacêuticos e médicos [6, 9].

A maior causa de infecção na sepse é por bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas a resposta inflamatória do hospedeiro também pode ser desencadeada por fungos e vírus [10]. Sessenta por cento dos casos ocorre pela invasão de bactérias Gram negativas e quarenta por cento são decorrentes de bactérias Gram positivas [11, 12]. Os sítios de infecção mais comuns são os pulmões, cavidades abdominais, trato urinário e infecções primárias na corrente sanguínea [5].

Quando as bactérias entram em contato com o hospedeiro, as células do sistema imunológico reconhecem os diferentes componentes bacterianos. [8]. Tais componentes ou moléculas derivadas de micro-organismos que podem ativar o sistema imune são chamadas de padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs). Os PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão, desencadeando a cascata inflamatória [13]. Os receptores da família Toll like receptors (TLR) são receptores de reconhecimento de padrão, responsáveis por se ligar a componentes bacterianos, virais, e fúngicos. Há cerca de 10 receptores da família TLRs envolvidos no reconhecimento de PAMPs [14]. TLR-1, 2, 4,5 e 6 são expressos na superfície celular e se ligam a produtos como ácido lipoteicóico (LTA) e peptidioglicano (TLR-2 e TLR-6) [15, 16], LPS (TLR-4) [17] e flagelina (TLR-5). Por outro lado, os receptores TLR-3, 7, 8 e 9 são

localizados em compartimentos intracelulares e identificam DNA de dupla-hélice viral (TLR-3), RNA monofilamentar viral (TLR-7 e TLR-8) e sequencia não metilada de DNA de bactérias e vírus (TLR-9) [6, 18].

Infecções por bactérias Gram positivas envolvem o reconhecimento de componentes da parede celular, como LTA e peptideoglicanos [15, 16]. Estas moléculas se ligam ao TLR2 [17], ativando a transdução de sinal, que culmina na liberação de mediadores inflamatórios [8]. Outra característica importante para desencadear sepse por organismos Gram positivos é a liberação de potentes exotoxinas, como: alfa toxina produzida por *Staphylococcus aureus*, a enterotoxina B produzida por *Staphilococcus* [6] e o pirogênio liberado pelo *streptococcus pyogenes* [5].

O componente bacteriano mais bem estudado é o Lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina encontrada na parede de bactérias Gram negativas [8]. O processo inicia-se com a ligação do LPS à proteína ligadora de LPS (LBP), que atua como catalisadora da ligação entre o LPS e o CD14. O CD14 reconhece o complexo LPS-LBP, o apresentando ao TLR4 [5]. O TLR4 é um receptor transmembrana, presente nas células – alvo, associado a uma molécula acessória, a MD-2, que possibilita maior sensibilidade ao LPS [6].

Após ligação do LPS/LBP ao CD14 e ao TLR4/MD-2, há ativação da cascata de sinalização intracelular. Esta cascata culmina na liberação do fator de transcrição nuclear κB (NF-κB). O NF-κB se localiza no citoplasma, no estado inativo, ligado a um inibidor de proteína κB (IκB). Quando ativada a cascata de sinalização, proteínas quinases estimulam a fosforilação do

IκB, liberando o NF-κB, que migra para o núcleo estimulando a transcrição gênica de diversos mediadores inflamatórios [19]. Esta ativação pode ser estimulada por LPS, citocinas e/ou espécies reativas derivadas de oxigênio (ERO) [20, 21]. O NF-κB é um fator chave para transcrição gênica na resposta inflamatória e consequentemente na patogenicidade da sepse [22-24].

Na resposta imune há duas fases distintas que se sobrepõem durante a sepse: a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e a síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS). SIRS é caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo algumas citocinas, como fator de necrose tumoral α (TNF-α), interleucina (IL) 1β, quimiocinas, leucotrienos, moléculas de adesão, ERO e óxido nítrico (NO). Esses mediadores produzem as seguintes alterações clínicas: vasodilatação periférica, depressão miocárdica, diminuição do volume intravascular, aumento do metabolismo [25], febre, taquicardia, taquipnéia e leucocitose [26]. Esta fase inicial da sepse é contra-regulada pela CARS, na qual há liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL- 4 e fator de crescimento transformador β (TGF-β) [27], que podem levar a imunodepressão, deixando o hospedeiro suscetível a uma segunda infecção [28].

Uma característica importante que ocorre durante a sepse é a complexidade em manter um equilíbrio na resposta inflamatória, que varia da resposta adequada à excessiva [5]. A redução do recrutamento de neutrófilos na sepse grave é um dos fatores que contribuem para resposta

do hospedeiro exacerbada. Os neutrófilos são um componente importante na resposta imune inata durante a doença, liberando citocinas, quimiocinas e leucotrienos; fagocitando micro-organismos e contribuindo diretamente na morte do organismo invasor [29].

1.2 Recrutamento de neutrófilos na resposta inflamatória

Neutrófilos são os principais leucócitos recrutados para o sítio de infecção. Essas células apresentam a maquinaria para eliminação de bactérias, devido a sua capacidade fagocitária [30], liberação de ERO e de espécies reativas de nitrogênio (ERN), além de proteínas com atividade proteolíticas e microbicidas, estocadas nos grânulos [6].

Neutrófilos se originam a partir de células mieloides multipotentes, que se diferenciarão em monócitos e neutrófilos [31]. Quando maduras estas células são liberadas na corrente sanguínea. Por dia cerca de $5X10^{10}$ – $10X10^{10}$ neutrófilos são formados na medula óssea, na qual passam a maior parte da vida [32]. Entretanto sob condições fisiológicas, cerca de 2% dos neutrófilos são encontrados na corrente sanguínea, na qual circulam durante aproximadamente 6h. Após este período estas células entram em apoptose e são retiradas pelo fígado, baço e medula óssea [29]. Durante reações inflamatórias, como na fase inicial da sepse, neutrófilos são mobilizados rapidamente da medula óssea para corrente sanguínea. Essa mobilização permite o aumento do número dessas células disponíveis para o recrutamento [33]. A migração de neutrófilos do compartimento intravascular para o extravascular ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares.

Esse mecanismo é mediado por uma combinação de processos mecânico, químico e molecular, ligados por uma sequência temporal [34].

Quatro fases distintas da migração dos neutrófilos são descritas: mobilização, marginação e rolamento, aderência e transmigração do vaso para o tecido inflamado ou infectado [29]. O passo inicial para migração dos neutrófilos é a mobilização dos neutrófilos da medula óssea para a corrente sanguínea [32]. A marginação leucocitária é o próximo passo para o recrutamento e consiste na mobilização dos neutrófilos do centro dos vasos para periferia. Este evento permite interação molecular entre a superfície celular do neutrófilo com as células endoteliais, resultando no rolamento do neutrófilo pela superfície das vênulas pós-capilares. O rolamento é dependente de forças moleculares e físicas, sendo mediadas por selectinas e seus ligantes [35].

As selectinas são moléculas de adesão de superfície, da família das glicoproteínas que incluem E-selectina (expressa em células endoteliais), P-selectina (expressa em plaquetas e células endoteliais) e L-selectina (expressa na membrana de neutrófilos, monócitos e linfócitos) [35]. As selectinas controlam o movimento de rolamento dos leucócitos ao longo da parede do vaso [36].

O rolamento de neutrófilos é um pré-requisito para adesão nos vasos sanguíneos, mas a ligação dependente de selectina não possibilita uma adesão firme. Desta forma, o processo evolui para uma terceira fase da migração dos neutrófilos, que consiste na forte aderência dos mesmos com

as células endoteliais [36]. Esta fase requer a ativação de moléculas de adesão da família das integrinas [33].

As integrinas são proteínas heterodiméricas de superfície celular, compostas de 2 cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente, as subunidades α e β, que compõe as subfamílias de moléculas de adesão [18]. A subfamília β_2 – integrina, ou CD11-CD18, abrange as moléculas l*ymphocyte function – associated antigen-1* (LFA-1) ou CD11a-CD18 e *macrophage – antigen-1* (Mac-1) ou CD11b-CD18 [6] moléculas presentes nos neutrófilos, participando da adesão ao endotélio [33].

As integrinas se ligam aos membros da família das imunoglobulinas presentes em membranas de células endoteliais, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e 2 (ICAM-2) e a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) [37]. ICAM-1 é expressa constitutivamente na membrana de células endoteliais, entretanto sua expressão aumenta significativamente após ativação do endotélio por citocinas (TNF-α e IL-1) liberadas durante o processo inflamatório [35]. Essa molécula se liga a CD11a/CD18 e CD11b/CD18. ICAM-2 não é regulada por citocinas, e sua expressão é constitutiva na membrana de células endoteliais. ICAM-2 se liga a CD11a/CD18, entretanto com menor afinidade que ICAM-1 [38]. A VCAM-1 liga-se a molécula $\alpha_4\beta_1$, mediando à infiltração de monócitos, eosinófilos e linfócitos [6].

A última fase decorrente do recrutamento de neutrófilos é a de transmigração, que envolve a passagem destas células através das junções entre as células endoteliais (*tight junctions*) para o tecido infectado ou

lesionado. Este processo é dependente das concentrações de componentes bacterianos, leucotrieno B_4 e quimiocinas [27, 33]. Estudos mostraram que neutrófilos participam diretamente ou indiretamente da produção de quimiocinas, regulando a resposta imune [39].

As quimiocinas pertencem a uma família de pequenas proteínas, divididas em três grupos conforme a posição dos resíduos de cisteína: CC, CXC e CX3C. São produzidas por macrófagos, células endoteliais e epiteliais, e exercem uma função importante no recrutamento de leucócitos. A liberação destas quimiocinas é estimulada por uma série de fatores, notavelmente mediadores pró-inflamatórios e componentes bacterianos como LPS [38].

CXCL8 (ou IL-8) foi a primeira quimiocina identificada, descoberta em 1988 e está relacionada principalmente com recrutamento de neutrófilos [40]. Camundongos não possuem CXCL-8, mas outras duas quimiocinas homólogas foram descritas: a CXCL-1 e CXCL-2, ambas participam da infiltração de neutrófilos [39].

As quimiocinas participam de todas as fases no recrutamento de neutrófilos, desde a liberação destes da medula óssea para a corrente sanguínea até a transmigração dos neutrófilos para o tecido inflamado ou infectado. Na primeira etapa, a regulação é feita antagonistamente pelo receptor de quimiocinas CXC (CXCR) 2 e CXCR4, ambos expressos em neutrófilos. CXCR4 retém estas células na medula óssea, enquanto que CXCR2 facilita sua saída. Os ligantes do receptor CXCR4 são produzidos por osteoblastos, caso do fator derivado de células estromais (do inglês

"*stromal cell derived factor"* -SDF)-1 ou quimiocina CXCL12). Os ligantes do CXCR2, as quimiocinas CXCL1 e CXCL2 são produzidos por células endoteliais. Durante a fase aguda da inflamação a mobilização dos neutrófilos da medula óssea é orquestrada pelo fator estimulador de colônia de granulócitos (do inglês "*granulocyte colony-stimulating factor"* (G-CSF)). G-CSF mobiliza os neutrófilos indiretamente, mudando o equilíbrio entre SDF-1 e os ligantes do CXCR2 na medula óssea. Esta molécula promove este processo reduzindo o número absoluto de osteoblastos, a maior fonte celular de SDF-1, enquanto que simultaneamente aumenta CXCL-1 e CXCL-2 e reduz SDF-1 nas células endoteliais da medula óssea [32].

Enquanto os neutrófilos rolam pelo endotélio são ativados por quimiocinas, que são ligadas ao endotélio via glicoaminoglicanos. Ativação de neutrófilos por estas moléculas aumenta a afinidade das integrinas por seus ligantes correspondentes, e subsequentemente uma firme adesão ao endotélio. Após a forte adesão os neutrófilos iniciam a transmigração. A contribuição de CXCL-1 e CXCL-2 na transmigração dos neutrófilos não estão limitadas apenas na ativação direta dos neutrófilos na superfície das células endoteliais, mas também nas próprias células endoteliais [32].

1.3 Perfil de citocinas na sepse

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, cruciais para a resposta imune. Em seres humanos saudáveis, as citocinas são produzidas constitutivamente em concentrações reduzidas, tendo função endócrina,

parácrina e autócrina [41]. A meia vida das citocinas circulantes, que não estão ligadas a receptores, pode variar de 5 minutos a algumas horas [7].

Quando o organismo está envolvido em aspectos patológicos, citocinas induzem SIRS e consequentemente MODS. De fato a sepse grave é marcada por uma expressão elevada de citocinas pró-inflamatórias, como: TNF-α e IL-1β [42]. Enquanto que por um lado, citocinas podem desencadear uma resposta inflamatória benéfica que estimula a coagulação local para restringir o dano tecidual. Por outro lado, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias pode ser ainda mais prejudicial que o insulto inicial. Na sepse, a resposta imune aguda e a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, constituem um desequilíbrio. Esta situação supera a regulação normal da resposta imune, produzindo uma resposta inflamatória desregulada [43].

A produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1, IL-12, interferon-γ (IFN-γ) e IL-6, são necessárias por iniciar o processo inflamatório contra infecção [7]. Essas citocinas ativam células como leucócitos, células endoteliais e epiteliais, no intestino e pulmão, induzindo a produção de mediadores inflamatórios como outras citocinas, quimiocinas, ERO, ERN além de enzimas proteolíticas [7]. Além disso, durante o processo inflamatório, ocorre liberação de citocinas anti-inflamatórias como, IL-10, IL-13 e IL-4 [44]. Estas citocinas são utilizadas no controle da resposta inflamatória podendo levar à imunossupressão do sistema imune do paciente.

- Fator de necrose tumoral - α

O TNF- α é um importante mediador da resposta inflamatória aguda. É uma citocina pró – inflamatória envolvida na resposta sistêmica e local [45], sendo importante na patogenicidade da sepse decorrente de lesão intestinal [46, 47].

O TNF-α é uma citocina produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, Natural Killer (NK) e linfócitos T, além de apresentar características pró-inflamatórias induzindo a liberação de outras citocinas, como IL-1, IL-6, IL-10 [6]. Esta molécula é um potente ativador do recrutamento de neutrófilos para o local infeccioso [18], aumentando a liberação de quimiocinas, moléculas de adesão, além de estimular atividades microbicidas dos neutrófilos e macrófagos [6, 18].

Outra característica do TNF- α, é que este age sistemicamente: no hipotálamo, influenciando na regulação da temperatura consequentemente induzindo febre; nos hepatócitos aumentando a síntese de proteínas séricas, que constitui a fase aguda em resposta ao estímulo inflamatório. Além disso, inibe a contratilidade do miocárdio e o tônus da musculatura lisa dos vasos, resultando na queda acentuada da pressão sanguínea. Também aumenta a perda de células musculares e adiposas, resultando na supressão do apetite [18].

- Interleucina – 6

IL-6 é uma citocina produzida por fagócitos mononucleares ativados, células endoteliais e fibroblastos, normalmente produzida no tecido local e

liberada na circulação em situações como endotoxemia, trauma, infecções agudas e sepse [48]. IL-6 apresenta funções tanto na imunidade inata quanto adaptativa estimulando a produção de proteínas da fase aguda pelos hepatócitos, bem como o crescimento de Linfócitos B produtores de anticorpos [18].

IL-6 geralmente esta aumentada em pacientes com sepse grave, e a concentração de IL-6, não de TNF-α, tem mostrado uma relação direta com mortalidade nos pacientes [49]. Entretanto estudos em humanos e animais não mostraram o mecanismo desta citocina no choque séptico [8]. Um estudo com bloqueio de IL-6 em modelo de CLP demonstrou melhora na sobrevida e redução da expressão de C5aR [50].

- Interleucina – 10

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória sintetizada por células Th2, monócitos e linfócitos B, além de inibir a produção de citocinas sintetizados por células Th1, como interferon gama (IFN-γ) e IL-12 [6]. Inibe a atividade dos macrófagos na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-1 [51-54] em infecção grave e sepse [53]. Camundongos, *Knockout* para IL-10, desenvolvem doença inflamatória intestinal, uma hipótese é ativação exagerada dos macrófagos. Além dos animais apresentarem inflamação excessiva e lesão tecidual [18].

A IL-10 é um potente inibidor da produção de citocinas por monócitos [55], possivelmente por bloquear a ativação de NF-κB através da inibição da atividade de IκB quinase [56].

1.4 Estresse oxidativo

Durante a sepse, há ativação de neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, que liberam uma série de mediadores, como citocinas, quimiocinas e NO [5].

O NO é um componente hidrofóbico que se difunde facilmente através da membrana das células. É produzido através da reação de oxidação da L-arginina com oxigênio, catalisada pela família de enzima: óxido nítrico sintase (NOS) [57]. Há três isoformas identificadas dessa enzima: neuronal (nNOS ou tipo 1), induzida (iNOS ou tipo 2) e endotelial (eNOS ou tipo 3). Os tipos 1 e 3 são isoformas constitutivas, produzem quantidades de NO necessária para funções fisiológias. Entretanto o tipo 2 pode ser induzida durante resposta imune e inflamatória, por componentes bacterianos, como LPS; citocinas, como TNF-α, IL-1 e interferon γ [58].

O NO é responsável pelo relaxamento da musculatura vascular lisa e pela consequente queda da resistência arterial sistêmica [59]. Esta molécula está envolvida na vasodilatação, inibição de agregação plaquetária [60] e defesa do hospedeiro, além da indução de apoptose [61, 62].

Além dos efeitos citados acima, o NO interage com ânion superóxido (O_2^-), formando peroxinitrito ($ONOO^-$), um forte agente oxidante [63]. Esta interação possibilita o estresse oxidativo, inicia peroxidação lipídica, lesão a proteínas como a nitração de resíduos de tirosina [35]. EROs são produzidas em células aeróbicas e divididas em dois grupos: radicais e não radicais. O primeiro grupo contém os componentes O_2^-, radical hidroxila (OH^-) e o NO^-. Estes contem pelo menos um par de elétrons desemparelhados na última

camada, para manter a estabilidade os componentes tem alta afinidade em doar ou receber elétrons. No grupo de não radicais estão incluídos H_2O_2 e ozônio [57]. Sabe-se que participam de uma variedade de reações que causam danos teciduais, como estresse oxidativo [64].

O termo estresse oxidativo é a situação na qual a produção de EROs supera a eficiência dos mecanismos de defesa, causando lesão a estruturas celulares. Entre as principais estruturas que são danificadas durante o estresse oxidativo, estão o DNA, a membrana lipídica e proteínas. Todas as membranas celulares são sensíveis ao estresse oxidativo, devido à alta concentração de ácido graxo insaturado. Esse processo é chamado de peroxidação lipídica, quando iniciado ativa uma reação em cadeia resultando em danos nos lipídios da membrana [57]. No qual há um rearranjo molecular na membrana que modifica as características físicas e químicas acarretando em lesão e morte celular [6].

As proteínas também são um alvo biológico vulnerável durante o estresse oxidativo. EROs, como radical OH^- e ERN podem causar lesão a proteínas. Entre os danos a estas moléculas, são exemplos a peroxidação, danos aos resíduos de aminoácidos específicos, mudanças na estrutura terciária, degradação e fragmentação [6]. As consequências da lesão a estas estruturas estão associadas à perda da atividade enzimática, alteração de funções celulares, como produção de energia, interferência no potencial de membrana, e mudanças nos tipos e concentrações de proteínas celulares [57].

1.5 Solução salina hipertônica

A solução salina hipertônica (SH), descrita a priori em 1980, em um estudo realizado por Velasco e colaboradores, mostrou que volumes reduzidos de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 7,5% restaurou parâmetros vitais. Eles mostraram que se restabeleceu a pressão sanguínea e equilíbrio ácido – básico, aumentou pressão arterial média, débito cardíaco, fluxo mesentérico e diminuiu frequência cardíaca. Além de restaurar estes parâmetros a administração de solução salina hipertônica (SH) aumentou a sobrevida de cães submetidos ao choque hemorrágico [65]. Desde 1980, a solução salina hipertônica 7,5% (SH) tem sido estudada, na dose de 4ml/kg injetadas em vasos periféricos [65-70].

O efeito inicial da solução salina hipertônica é o aumento da osmolaridade sanguínea de 20 a 30 mOsm/L, causado por uma interação física. Isso ocorre devido ao gradiente osmótico, pois o endotélio capilar é permeável ao Na+ e a membrana plasmática não o é, ocorrendo mobilização de fluidos do compartimento extravascular para o intravascular [71]. Isso acarreta o aumento de contração do miocárdio, reduzindo o edema no endotélio e nos tecidos, sendo responsável pela diminuição da viscosidade sanguínea [72-77]. Outra consequência da expansão do volume plasmático é o aumento do fluxo sanguíneo na circulação periférica e microcirculação, e consequentemente redução da resistência vascular, vasodilatação arterial, devido aos efeitos relaxantes da hipertonicidade nos músculos lisos dos vasos [71, 78]. O uso de SH após hemorragia produz aumento do fluxo sanguíneo coronário, renal e intestinal [71].

A SH além de aumentar o volume plasmático, tem efeitos anti-inflamatórios [78], que modulam favoravelmente eventos celulares em pacientes após choque hemorrágico [79]. A inibição da expressão de TNF-α e o aumento da produção de IL-10 por macrófagos alveolares sugerem um mecanismo protetor em relação à reposta inflamatória sistêmica. [80].

Efeitos físicos e fisiológicos da ressuscitação, com um pequeno volume de SH, são essenciais principalmente se aplicados em curto prazo [71]. Uma rápida ressuscitação é adequada para evitar o desenvolvimento de distúrbios na micro - circulação e disfunção múltipla de órgãos [81].

A ressuscitação com SH tem um potencial significativo na imunomodulação em pacientes após traumas que depois podem desenvolver sepse [82, 83]. Os efeitos da SH nas células regulam a expressão e liberação de elastase, citocinas e EROs. Após trauma, há redução da proliferação de linfócitos T e da produção de IL –2, além de inibir as células mononucleares *"in vitro"*. [84-87]. Outro fator é a redução da função imunológica celular, pois a ressuscitação com SH restaura a função de esplenócitos e de células do sistema imune [85].

Os neutrófilos e os macrófagos são responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo e são ativados quando há danos nos tecidos ou infecção [88]. Estudos mostram que a SH reduz a função dos neutrófilos, enquanto aumenta a função dos linfócitos – T após choque hemorrágico [79, 89-91]. Há uma redução de lesão nos órgãos de ratos com choque hemorrágico que foram tratados com SH [92].

Um estudo demonstra que 24h após indução de choque hemorrágico com segundo insulto infeccioso por ligadura e perfuração cecal (CLP), animais que receberam SH apresentam menor quantidade de bactérias no sangue, redução na formação de abscessos no fígado e pulmão, e menor dano tecidual hepático e pulmonar [25]. A sepse apresenta alta taxa de mortalidade (30% - 80%), e mesmo com o aumento do conhecimento sobre os mecanismos que ocorrem durante essa doença, as medidas terapêuticas não tem apresentado grandes modificações na taxa de sobrevida dos pacientes [93]. A SH é uma alternativa terapêutica e recentemente, foi realizado um estudo piloto em pacientes com choque séptico, no qual o tratamento com SH aumenta a contratilidade cardíaca e o volume intravascular [94].

Esses efeitos anti-inflamatórios e na microcirculação citados acima, assim como na atividade e secreção de proteínas, indicam um caminho promissor como alternativa terapêutica para resposta inflamatória na sepse. Embora os efeitos da SH se mostrarem positivos após choque hemorrágico com segundo insulto infeccioso, e os efeitos benéficos observados no estudo com humanos, ainda são necessários estudos em outros modelos que confirmem o mecanismo de ação da SH na sepse.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os mecanismos da solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) na resposta inflamatória na sepse polimicrobiana.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Induzir sepse através da ligadura e perfuração cecal em camundongos, observar a sobrevida e comparar com a de camundongos sépticos tratados com solução salina hipertônica 7,5% ou solução salina fisiológica 0,9%.

Justificativa: Utilizou-se o modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP), para mimetizar a sepse, com infecção polimicrobiana. O modelo de CLP além de ser clinicamente relevante, o que mais se assemelha com a sepse observada em seres humanos, é de fácil reprodutibilidade. Este procedimento estabelece uma infecção com presença de bactérias Gram – negativas e Gram – positivas na cavidade peritoneal. Dados da literatura mundial apontam que sepse está associada à alta taxa de mortalidade. No Brasil, dados do estudo BASES (Brazilian Sepsis Epidemological Study), mostram que sepse apresenta aproximadamente 34% de mortalidade, sepse grave 47% e choque séptico 52%. Sendo extremamente necessária uma medida terapêutica eficaz para combater esta doença para reduzir a taxa de mortalidade.

2.2.2 Avaliar o mecanismo da SH no recrutamento de neutrófilos

Justificativa: Após choque hemorrágico a SH reduz o número de neutrófilos no tecido inflamado. Alguns estudos demonstraram que após modelo de 2-hit (após choque hemorrágico é realizado um segundo insulto, geralmente infeccioso) houve redução de neutrófilos no pulmão. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos, pois apresentam a maquinaria para eliminação de bactérias. Maquinaria que inclui capacidade fagocitária, liberação de ERO e de ERN, além de proteínas com atividade proteolíticas e microbicidas, estocadas nos grânulos. Frente a isso, torna-se importante descobrir o mecanismo pelo qual a SH atua na redução destas células.

2.2.3 Avaliar o perfil inflamatório e imunomodulatórios em camundongos sépticos, tratados com solução salina hipertônica 7,5%, (4mL/kg).

Justificativa: A ação da solução hipertônica pode modular a produção de mediadores inflamatórios e imunomodulatórios após modelo de 2-hit. Este é um modelo que ocorre com frequência clinicamente, mas só o choque hemorrágico *per se* induz a resposta inflamatória. Além de, frequentemente a SH ser injetada anteriormente ao segundo insulto, geralmente infeccioso. No presente estudo, o primeiro insulto será infeccioso (por ligadura e perfuração cecal), que também é clinicamente relevante, ocorrendo com frequência. E a SH é infundida após este primeiro insulto. Este modelo é uma alternativa para entender por qual mecanismo a solução salina

hipertônica modula a resposta inflamatória após infecção, avaliando assim, os efeitos desta solução, no foco infeccioso e em um órgão distante.

2.2.4 Avaliar o subproduto do óxido nítrico (Nitrito) e estresse oxidativo (peroxidação lipídica) em camundongos sépticos.

Justificativa: Ao analisar os efeitos da solução salina hipertônica no estresse oxidativo pode-se verificar se há redução desses mediadores após indução de sepse, estes que estão envolvidos no dano tecidual. Análise bioquímica dessas substâncias nos tecidos pulmonar e intestinal.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Camundongos Balb-C (8 a 10 semanas) machos foram obtidos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em gaiolas (10 cm x 20 cm) no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia – Departamento de Clínica Médica com água e ração “ad libidum” e em temperaturas ambiente controlada entre 22ºC ± 2ºC.

3.2 Anestésico

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com pentobarbital 20 mg/ml (0,05 ml/10g de peso).

3.3 Modelo experimental de sepse polimicrobiana

O modelo de indução de sepse utilizado foi de ligadura e perfuração cecal. Após anestesia e laparotomia nos camundongos, foi realizada ligadura cecal com comprimento de 1,5cm, com fio de algodão, seguida de duas perfurações com agulha 22G (30X8 mm).

3.4 Reposição volêmica

Os animais receberam solução salina fisiológica 0,9% (3,4 ml/100g de peso – 34 ml/kg) ou solução salina hipertônica 7,5% (0,4 mL/100 g de peso – 4 mL/kg) intravenosamente (i.v.), através da veia caudal, 30 minutos após CLP.

3.5 *Grupos (in vivo)*

- Grupo CLP – Camundongos Balb-C submetidos à Ligadura e Perfuração Cecal (CLP).
- Grupo SS – Camundongos submetidos à CLP e tratados com solução salina fisiológica 0,9% (3,4 ml/100g de peso – 34 ml/kg).
- Grupo SH – Camundongos submetidos à CLP e tratados com solução salina hipertônica 7,5% (0,4 mL/100 g de peso– 4 mL/kg).
- Grupo controle (C) – Camundongos que não foram submetidos a nenhum tipo de cirurgia ou reposição volêmica.

Para cada grupo utilizamos 8 a 10 camundongos.

3.6 Taxa de sobrevida

Noventa camundongos Balb-C, divididos entre os grupos CLP (30), SS (30) e SH (30), após anestesia, foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos descritos acima. Durante sete dias, os camundongos foram mantidos em gaiola, com água e ração ad libitum. Os animais foram

observados e os óbitos foram registrados a cada 12h. A taxa de sobrevida foi analisada pela porcentagem de sobrevida dos animais.

3.7 Protocolo de estudo

Os camundongos foram sacrificados após 6h, 12h, e 24h da indução de sepse e coletadas amostras de intestino, pulmão e lavado peritoneal. As amostras foram armazenadas em freezer -80ºC, para posterior realização de experimentos.

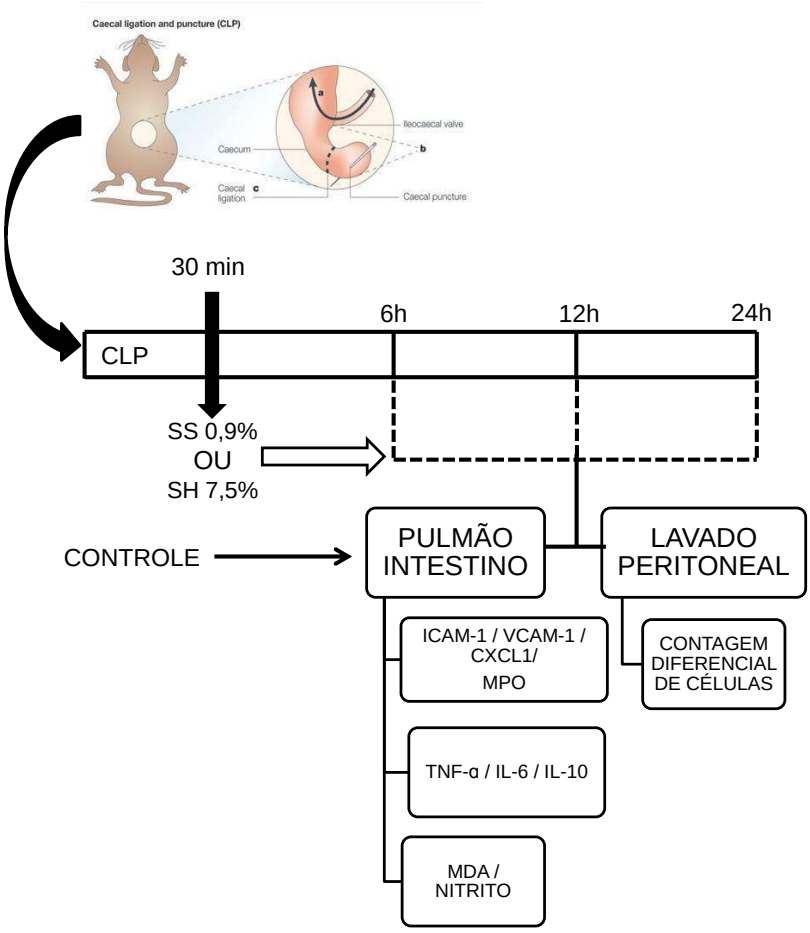

Figura 1 – Protocolo de estudo

Figura modificada e adaptada de *Buras JA, Holzmann B and Sitkovsky M; nature reviews drug discovery 2005.*

3.8 Preparo das amostras para dosagem de proteínas no pulmão e intestino

A extração de proteínas foi realizada através da pulverização em gral de aço inoxidável e pistilo de cerâmica em nitrogênio líquido. Após a homogeneização os tecidos foram ressuspensos em tampões específicos para cada experimento. O material coletado foi acondicionado a -80°C até o momento da dosagem.

3.9 Quantificações de proteína

Para cada experimento (MDA, MPO, ELISA, Griess) foi realizada a quantificação de proteína, pois cada um necessita de normalização pelas mesmas, ou seja, correção da leitura pela quantidade de proteína que há na amostra.

A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de Bradford (Bio Agency®) nos homogenatos de tecidos, para normalização das análises.

3.10 Infiltração de neutrófilos pelo método de quantificação de mieloperoxidade

A mieloperoxidase é uma enzima relacionada com as células brancas do sangue associada com inflamação e infecção. A explosão (“burst”) oxidativa decorrente da ativação do neutrófilo é uma das responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio. A dosagem

de mieloperoxidase foi utilizada como um índice de infiltração neutrofílica nos tecidos (Soriano et al., 2002).

Aproximadamente 100 mg de tecido foram pulverizados, e ressuspensos em 1 ml de solução de MOPS (10 mM e hexa-decil-trimetil-amonio-brometo (HTAB) 125 mg para cada 25 ml de solução). As amostras foram homogeneizadas por 1 hora em agitador do tipo gangorra e em sonicador (Fisher Scientific® sonic dismembrator model 100) por 3 vezes durante 3 segundos. Após esse procedimento foram centrifugadas a 10000 rpm (10621g) por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e mantido a -80°C até o momento da dosagem.

O experimento consistiu em reagir amostras ou padrões em volume de 20µL com 20 µL tetrametilbenzidina 16 mM em DMSO e 140 µL de PBS. Após 5 minutos adicionamos 20 µL H_2O_2 a 0,03%. A absorbância foi obtida utilizando comprimento de onda de 650 nm em leitor de placa VersaMax™ Microplate Reader (Molecular devices, Minnesota, USA).

3.11 Quantificação de mediadores inflamatórios

ELISA ou EIA (Enzyme Immunoassay) é um teste imunoenzimático de boa sensibilidade e especificidade, que permite a detecção de antígenos ou de anticorpos específicos.

Os mediadores inflamatórios teciduais (no intestino e pulmão) foram dosados a partir do homogenato de tecido ressuspenso em 1mL de tampão de NP40 (1% NP40; 10% de glicerol; 135mM NaCl; 20 mM tris base). As amostras foram homogeneizadas em agitador do tipo gangorra por 1 hora

em gelo e centrifugadas a 10000 rpm (10621g) por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado a -80°C até o momento da dosagem.

A normalização dos mediadores dosados foi feita pela concentração de proteína total.

As dosagens dos mediadores inflamatórios foram realisadas pelo método de ELISA, seguindo as instruções do fabricante, com kit DuoSet da R&D Systems ®, citocinas: TNF-α (DY 410), IL-6 (DY406), IL-10 (DY417); moléculas de adesão: ICAM-1 (DY796) e VCAM-1(DY643); quimiocinas: CXCL1 (DY453).

Em placa de 96 poços foi acrescentado anticorpo de captura diluído em tampão fosfato (PBS) e incubado por 18h. A placa foi lavada com tampão de PBS 0,05% tween 20. Em seguida os sítios desocupados foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro de albumina bovina – Sigma) por 1h. Após incubação, a placa foi lavada e as amostras e a solução padrão foram colocadas nos respectivos poços por 2h. Após lavagem das placas, foi acrescido anticorpo de detecção biotinilado para cada mediador dosado, e incubado por 2h. As placas foram novamente lavadas e foram incubadas com conjugado streptoavidina peroxidase diluída em PBS 1:200 por 30 min. Novamente, após as placas serem lavadas foram incubadas com solução tetrametilbenzidina por 20 min. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 2N. A absorbância foi obtida pelo comprimento de onda de 450nm em leitor de ELISA VersaMax™ Microplate Reader (Molecular devices, Minnesota, USA).

3.12 Imunohistoquímica

Para analisar qualitativamente a moléculas de adesão, ICAM-1, utilizou-se a técnica de imunohistoquímica. Tecidos (pulmão e intestino) foram fixados em formalina e embebidos em parafina para secção em fragmentos de 3 a 5 μm e montagem em lamina histológica. Os fragmentos foram desparafinados em xilol, na sequência, o tecido foi reidratado com banhos sucessivos de álcool (absoluto 95º e 70º) seguido de banho com água corrente e banho com água deionizada. O bloqueio endógeno foi efetuado com banhos em uma solução de peróxido de hidrogênio 10 Volumes por 10 vezes durante 5 minutos, seguido de banho com água corrente, banho com água deionizada e banho com PBS.

As laminas foram lavadas em PBS. A recuperação foi realizada com solução de citrato de sódio 10mM, pH 9,0 em alta temperatura (panela de vapor- Steamer -pv) por 40 minutos. Após 20 minutos, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente e foram lavadas com PBS, 2 vezes por 5 minutos cada. Após lavagem, as laminas foram incubadas com caseína por 30 minutos para bloquear as reações inespecíficas. A incubação do anticorpo primário para ICAM-1 (Santa cruz ®, SC 1511), previamente diluído 1:300 em PBS com 1% de BSA, seguido por banho com PBS por 5 minutos, foi realizada por 16-18h a 4ºC. Em seguida os cortes foram incubados em câmara úmida durante 90 minutos a temperatura ambiente com anticorpo secundário biotinilado (Kit Vector), seguido por banho com PBS 3 vezes por 5 minutos cada.

Em seguida, os cortes foram colocados em solução de substrato DAB (3,3 Diaminobenzidina tetrahidroclorídrico, Sigma, D-5637) 1 mL/mg PBS 25µ H_20_2 3%/mL. Após 3 a 10mim para revelação, deixado em banho em água corrente por 5 minutos. Foi utilizado banho de Hematoxilina de Harris para contra corar, seguido de banho em água corrente por 10 minutos. Para finalizar, o tecido passou por banhos sucessivos de álcool (70º, 95º e álcool absoluto) e por uma ultima lavagem com xilol. O tecido foi então montado em lâmina com resina sintética Entellan® (Merck) para fixação da lamínula. As imagens foram adquiridas por câmera Nikon acoplada ao microscópio óptico Leica (Q500 iW, Cambridge, UK), em aumento de 400X.

3.13 Quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

A sensibilidade da medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) tem feito deste método uma boa alternativa para monitorar a peroxidação lipídica (Soriano et al., 2002), um dos grandes indicadores do estresse oxidativo.

Aproximadamente 100mg de tecido pulverizado foram ressuspensos em 1mL de KCl 1,15%. As amostras foram homogeneizadas em agitador tipo gangorra por 1 hora e centrifugadas a 10000 rpm por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos a -80°C até o momento da dosagem.

A partir do homogenato de tecidos, foi realizada a quantificação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, que consiste em utilizar

100 µl de amostra, adicionando-se 100 µl SDS a 8,1%, 750 µl de ácido acético a 20%, e 750 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,8%. Esta solução foi aquecida a 95 °C por 40 minutos. A solução foi centrifugada, e o sobrenadante foi utilizado para medir a absorbância utilizando comprimento de onda de 532 nm no leitor de placa VersaMax™ Microplate Reader (Molecular devices, Minnesota, USA).

3.14 Dosagem de Nitrito

A quantificação de óxido nítrico foi determinada indiretamente pela dosagem de nitrito no pulmão e intestino. Em uma placa com 96 poços foram acrescidos 50 µl das amostras ou curva padrão e 50 µl de solução de Griess (0,2% N-1 naftiletilenediamina, 2% sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico). Após 10 min. a absorbância foi determinada utilizando comprimento de onda de 540 nm em leitor de placa VersaMax™ Microplate Reader (Molecular devices, Minnesota, USA).

3.15 Contagem diferencial de células

A contagem diferencial de células no peritônio de camundongos sépticos foi realizada a partir do lavado peritoneal. O lavado foi coletado com solução salina esterilizada gelada, acrescida de soro fetal bovino a 10%. Após coletar o lavado, este foi centrifugado a 2000 rpm (425g) por 5 min. e o *pellet* ressuspenso em 1mL de tampão de hemólise (8,024g/L $(NH_4)Cl$; 0,084g/L $NaHCO_3$; 0,04g/L EDTA) Após 5 min. de incubação em gelo, as amostras foram novamente centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min. e o

pellet ressuspenso em 1 mL de PBS. As células foram contadas em contador automático (Millipore® - Handheld automated cell couter). As lâminas foram confeccionadas a partir da centrifugação da cytospin (Cytospin-2, *Shandon Instruments* Sewickley, EUA) a 450 rpm (22g) por 6 min. Após fixação com metanol, as laminas foram coradas com com *Diff-Quik* para a contagem diferencial celular (100 células/lâmina). As lâminas foram lidas em microscópio óptico com aumento de 1000X. Foi feita uma duplicata de cada lâmina.

3.16 Análise Estatística

Os valores foram expressos em média ± erro padrão. Para os experimentos bioquímicos, as médias dos grupos experimentais foram comparadas pelo método de variância (ANOVA) e o *post test* de turkey foi utilizado como *post-hoc test* para comparar grupos individuais. Significância estatística foi considerada quando $p<0,05$.

O teste de Log rank foi utilizado para análise da curva de sobrevida.

4 RESULTADOS

4.1 Taxa de Sobrevida

A análise da mortalidade mostrou que no grupo CLP a sobrevida foi de 33%. Entretanto, nos grupos que receberam reposição volêmica a sobrevida aumenta, sendo de 47% no grupo tratado com solução salina fisiológica e de 60% após tratamento com solução salina hipertônica (figura 2).

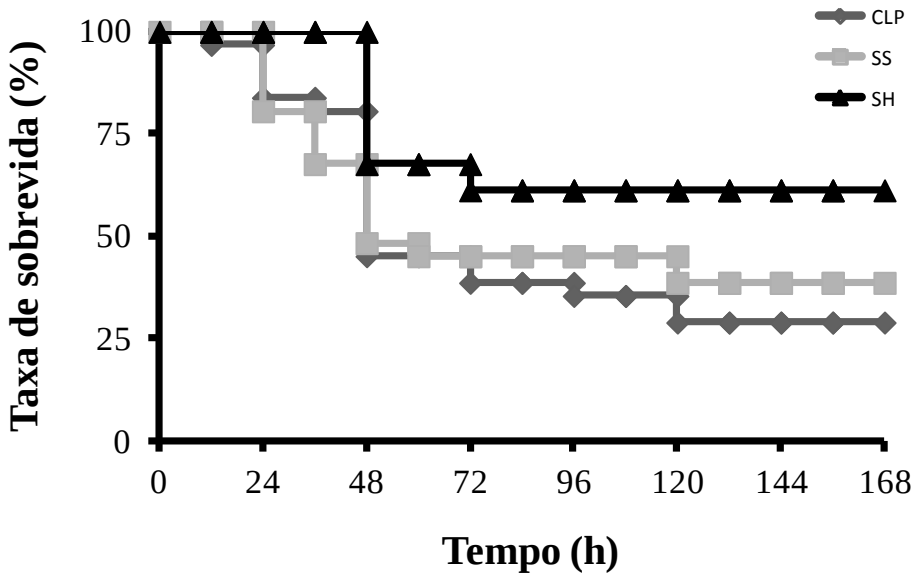

Figura 2 – Taxa de mortalidade

Camundongos Balb/c foram submetidos à modelo de sepse polimicrobiana e divididos em 3 grupos: **CLP** – no qual animais foram induzidos à sepse, através de ligadura e perfuração cecal; **SH** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). A sobrevida foi analisada durante 168h (7 dias). Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevida e os dados apresentados são de 30 animais em cada grupo.

4.2 Resposta inflamatória na Cavidade abdominal

4.2.1 INTESTINO

4.2.1.1 Infiltração de neutrófilos no tecido

Para esta finalidade, dosou-se a concentração de myeloperoxidase, enzima presente em grânulos de neutrófilos. Observou-se que após 6h, não houve um aumento desta enzima no grupo CLP em relação ao controle, assim como no grupo SS. Diferentemente, observou-se no grupo SH, que aumentou neutrófilos em comparação ao grupo CLP ($p< 0,05$) (figura 3a).

Entretanto após 12h e 24h houve um aumento do infiltrado destas células no grupo CLP em relação ao controle ($p< 0,05$). O grupo SS não apresentou alteração da quantidade de neutrófilos nestes períodos, mantendo os valores próximos dos basais. Entretanto no grupo SH reduziu a concentração de mieloperoxidase em comparação com grupo CLP ($p< 0,05$) (figura 3a).

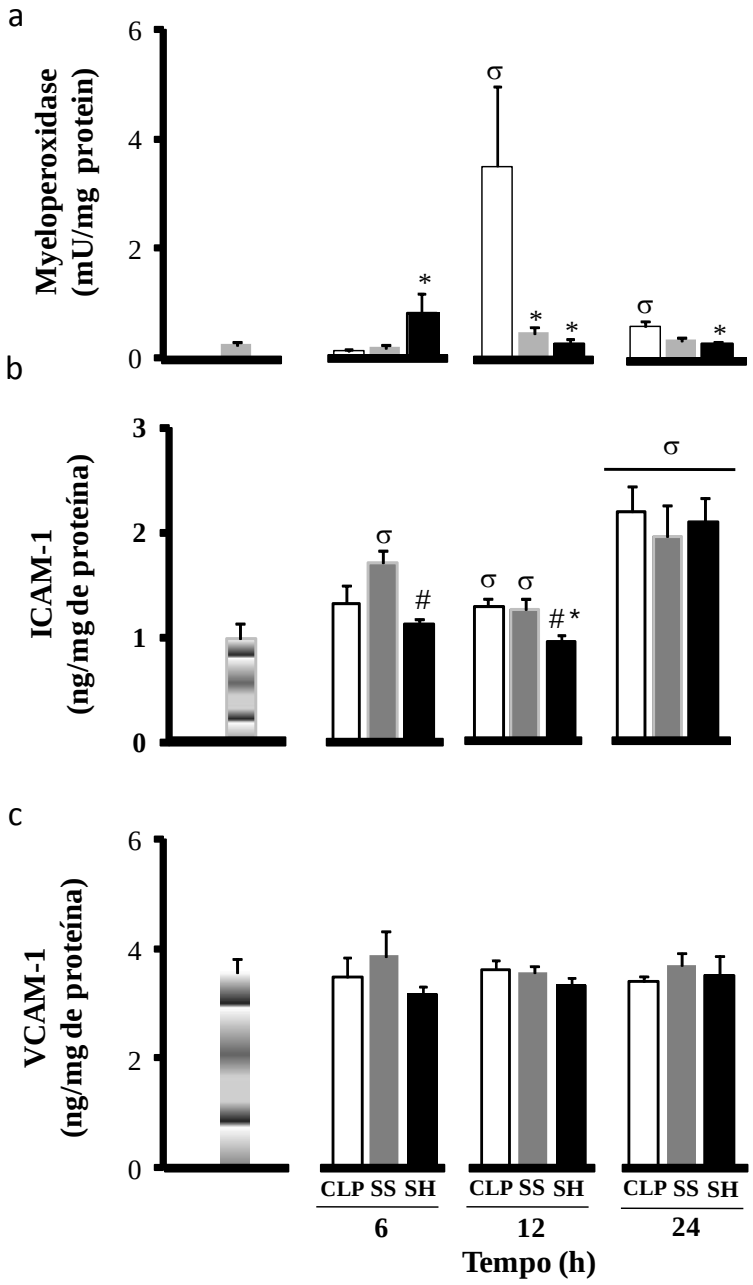

Figura 3 – Infiltrado de neutrófilos no intestino

Concentração de (a) mieloperoxidase, (b) ICAM-1 e (c) VCAM-1 foram dosadas em camundongos Balb/c submetidos à modelo de ligadura e perfuração cecal. Divididos em 3 grupos: **CLP** – animais submetidos à sepse, sem tratamento; **SH** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram sacrificados e amostras de intestino coletadas. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM. * *p<0,05 vs* CLP; # *p<0,05 vs* SS; σ *p<0,05 vs* controle.

- Moléculas de adesão

Tanto ICAM-1 quanto VCAM-1 são moléculas de adesão que participam da migração dos neutrófilos para os tecidos. Pelo método de ELISA, em 6h a produção de ICAM-1 não aumentou no grupo CLP e SS em relação ao controle. No grupo SH, entretanto observou-se um aumento de ICAM-1 em relação ao grupo SS ($p< 0,05$). Em 12h os grupos CLP e SS aumentaram a produção de ICAM-1 em relação ao grupo controle *($p< 0,05$*). Entretanto no grupo SH reduziu a concentração de ICAM-1 em relação aos grupos SS e CLP, se aproximando dos valores basais *($p< 0,05$*). Em 24h os grupos CLP, SS e SH aumentaram a concentração de ICAM-1 em relação ao controle (*$p< 0,05$*) (figura 3b).

Não houve nenhuma alteração na produção de VCAM-1 entre os grupos e períodos estudados (figura 3c).

Pelo método de imunohistoquímica em 6h, no grupo CLP observou-se presença de ICAM-1 nos vilos, e na camada submucosa. No grupo SS, ICAM-1 esta presente nos vilos, na camada sudmucosa e mucosa. Enquanto que no grupo SH observa-se marcação para ICAM-1 apenas nos vilos (figura 4). Em 12h nos grupos CLP e SS observaram-se marcação de ICAM-1 nos vilos, camada submucosa e mucosa. No grupo SH a presença se restringe a camada submucosa (figura 5). Em 24h, nos grupos CLP, SS e SH observaram-se marcação para ICAM-1 nos vilos, camada submucosa e mucosa (figura 6).

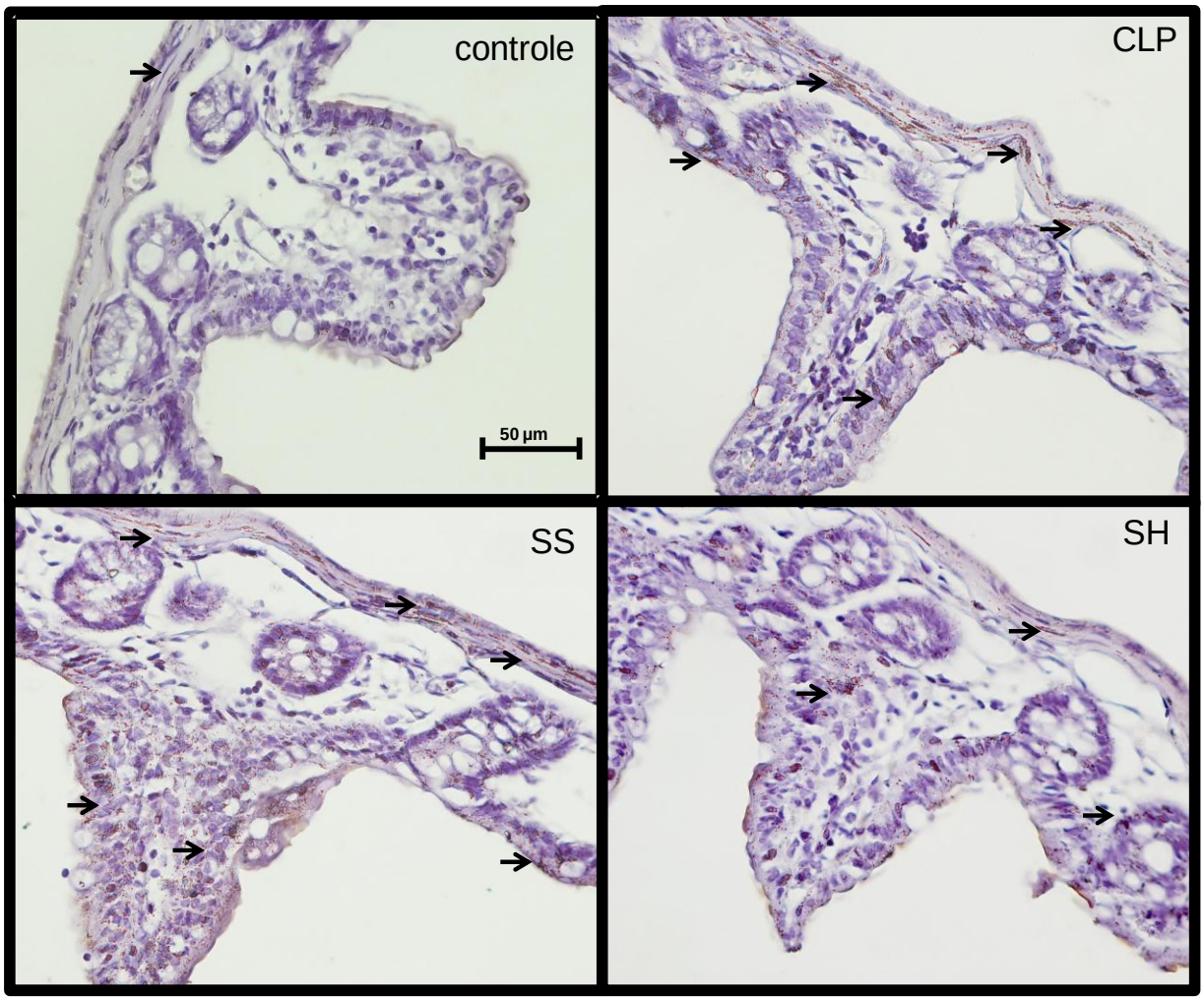

Figura 4 – Marcação de ICAM-1 no intestino (6h)

Camundongos Balb/c submetidos à modelo experimental de sepse polimicrobiana. Divididos em 3 grupos: **CLP** – no qual os animais foram induzidos à sepse, através do modelo de ligadura e perfuração cecal; **SH** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h os animais foram sacrificados e amostras de intestino coletadas para realizar imunohistoquimica com marcação para ICAM-1. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. (→) Marcação positiva de ICAM-1.

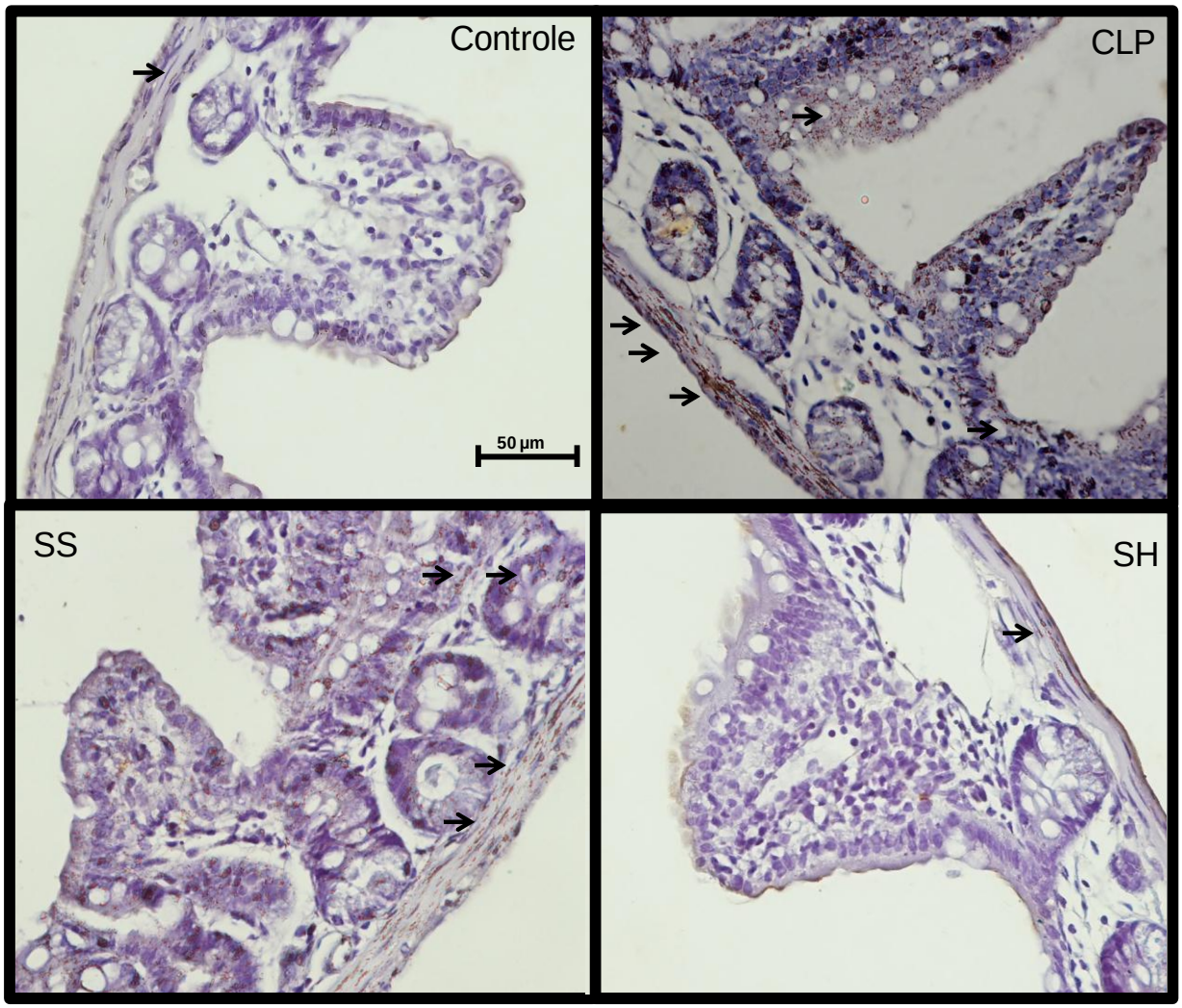

Figura 5 - Imunohistoquímica das moléculas de adesão (12h)

Camundongos Balb/c submetidos à modelo experimental de sepse polimicrobiana. Divididos em 3 grupos: **CLP** – no qual os animais foram induzidos à sepse, através do modelo de ligadura e perfuração cecal; **SH** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 12h os animais foram sacrificados, e amostras de intestino coletadas para realizar imunohistoquimica com marcação para ICAM-1. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. (→) Marcação positiva de ICAM-1.

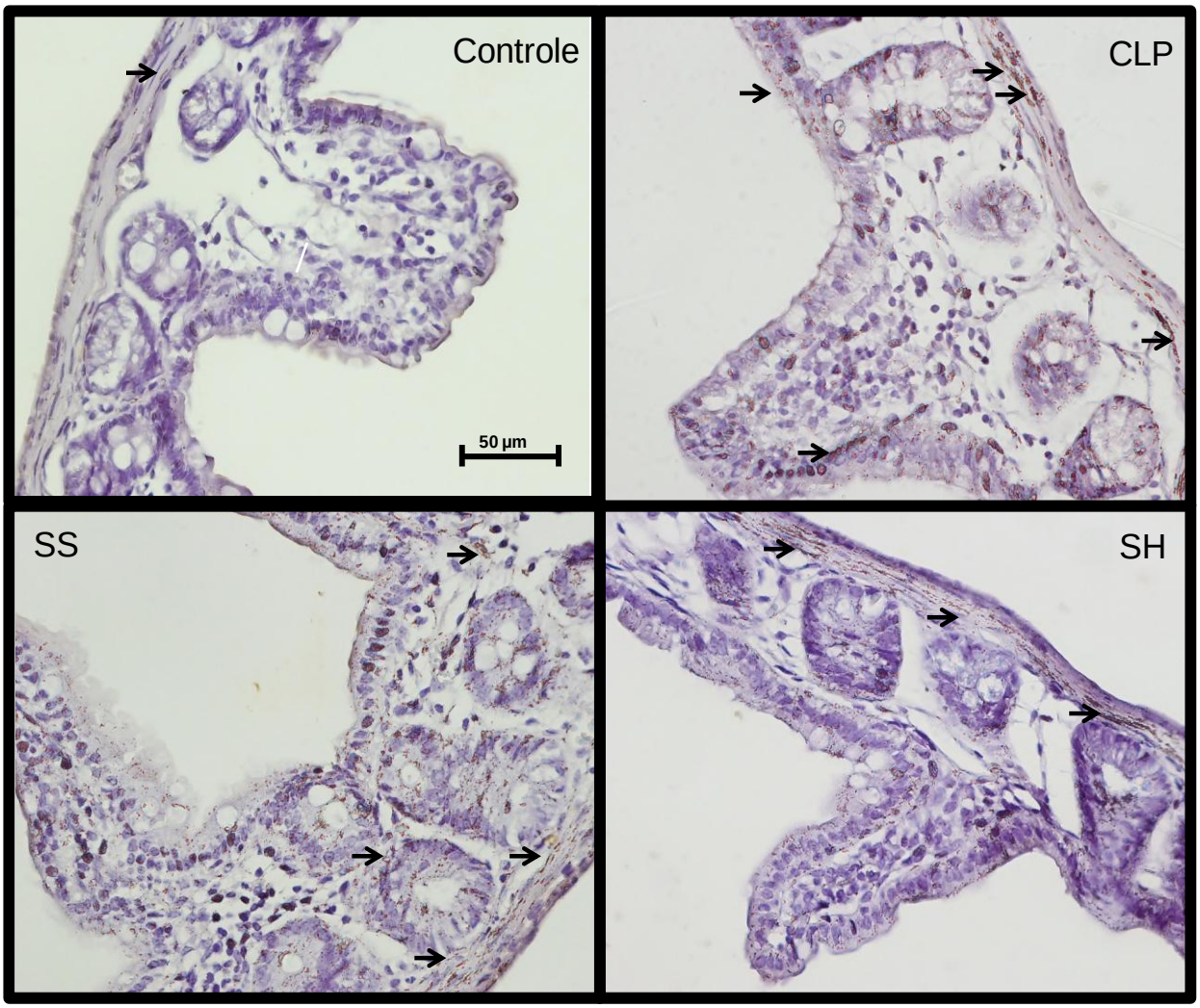

Figura 6 - Imunohistoquímica das moléculas de adesão (24h)

Camundongos Balb/c submetidos à modelo experimental de sepse polimicrobiana. Divididos em 3 grupos: **CLP** – no qual os animais foram induzidos à sepse, através do modelo de ligadura e perfuração cecal; **SH** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 24h os animais foram sacrificados, e amostras de intestino coletadas para realizar imunohistoquimica com marcação para ICAM-1. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. (→) Marcação positiva de ICAM-1.

- Quimiocina

Dosou-se a quimiocina CXCL-1, conhecida por participar do recrutamento de neutrófilos para o tecido. Em 6h observou-se um aumento da produção de CXCL-1 em todos os grupos estudados em relação ao grupo controle (p<0,05). Entretanto a concentração de CXCL-1 no grupo SH reduziu em relação ao grupo CLP *(p< 0,05*). Em 12h e 24h essa concentração manteve-se aumentada nos grupos CLP, SS e SH em relação ao controle *(p< 0,05*). Contudo em 24h nos grupos CLP e SH reduziram a concentração de CXCL-1 em relação ao grupo SS (*p< 0,05*) (figura 7).

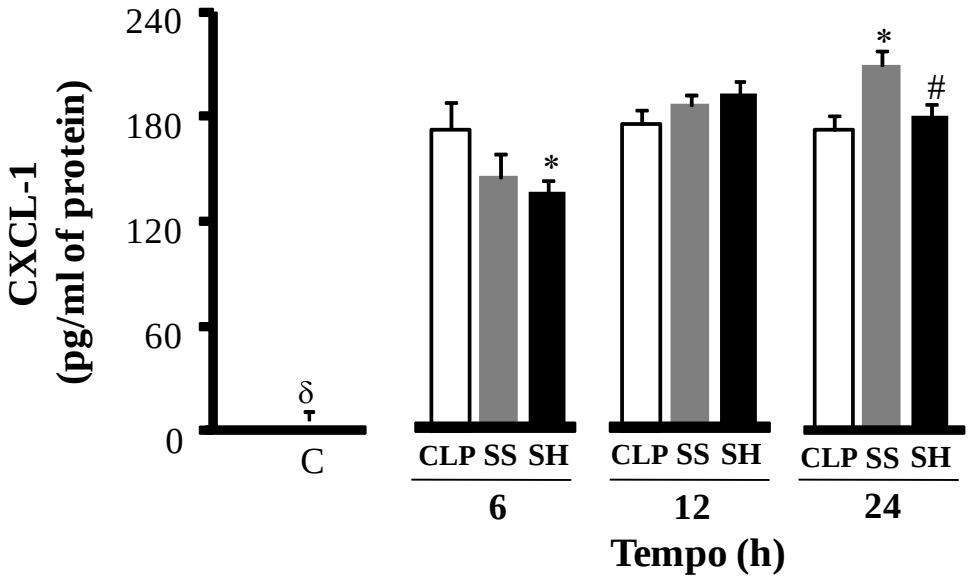

Figura 7 – Concentração de quimiocina no intestino

Concentração de quimiocina CXCL-1 foi dosada em camundongos Balb/c submetidos à modelo de ligadura e perfuração cecal. Divididos em 3 grupos: **CLP** – animais submetidos à sepse, sem tratamento; **SH** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM.

* *p<0,05 vs* CLP; # *p<0,05 vs* SS; δ *p<0,05 vs* todos os outros grupos.

4.2.1.2 Perfil inflamatório durante sepse experimental

Para avaliar o perfil inflamatório dosou-se citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10). Em 6h o grupo CLP apresentou um aumento da produção de TNF- α em relação ao grupo controle, SS e SH *(p< 0,05*). Em 12h e 24h, todos os grupos mantiveram a produção desta citocina próximo das concentrações basais (figura 8a).

A produção de IL-6 em 6h nos grupos CLP e SS apresentaram-se aumentadas em comparação com o grupo controle *(p< 0,05*). Em 12h, nos grupos CLP, SS e SH observou-se um aumento em relação ao controle *(p< 0,05*). Entretanto em 12h o grupo SS aumentou a concentração de IL-6 em relação aos grupos controle, CLP e SH *(p< 0,05*) (figura 8b).

A produção de IL-10 em 6h, nos grupos CLP e SS, não aumentaram em relação ao controle. Enquanto que no grupo SH reduziu a concentração desta citocina em relação aos grupos CLP e SS *(p< 0,05*). Em 12h e 24h a produção de IL-10 apresentou-se próxima das concentrações basais nos grupos CLP, SS e SH (figura 8c).

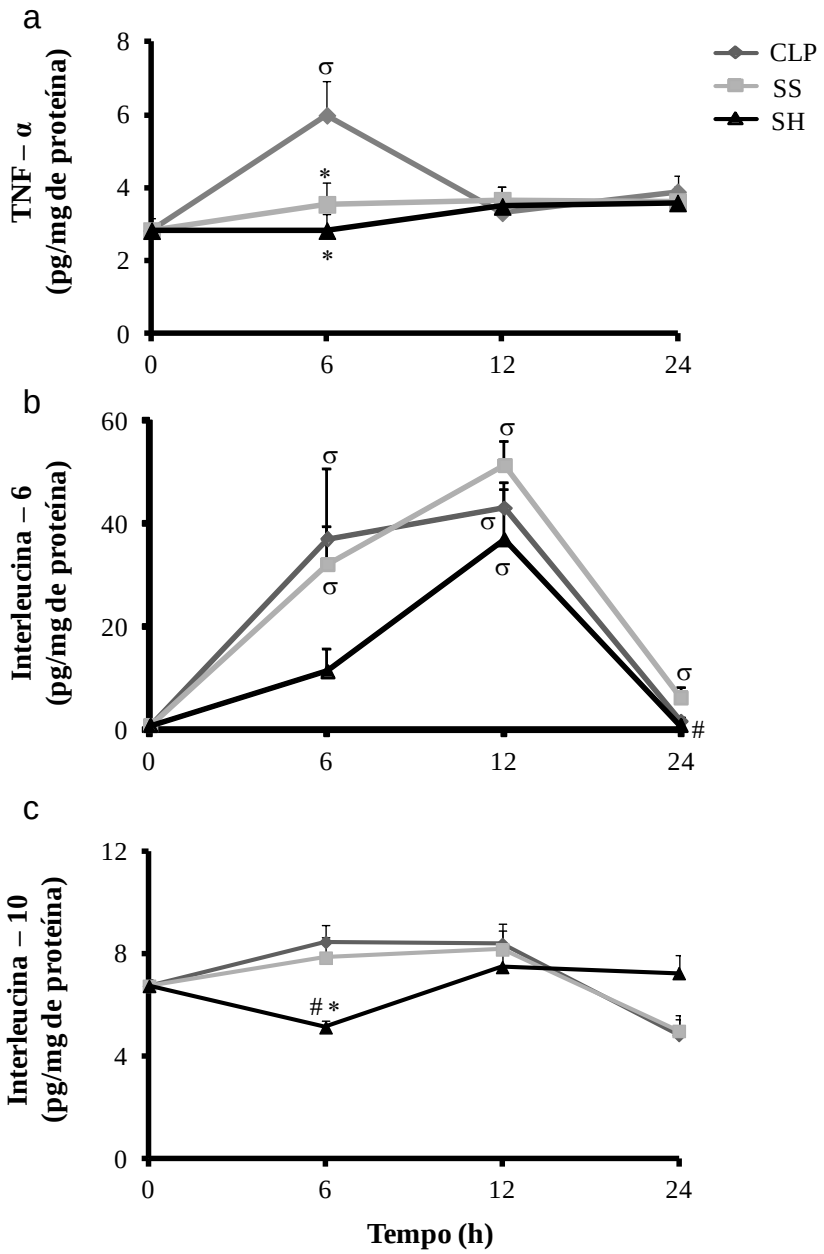

Figura 8 – Perfil inflamatório no intestino

Concentração de citocinas pró-inflamatórias: TNF-α (a), IL-6 (b) e anti-inflamatória: IL-10 (c) foram dosadas em camundongos Balb/c submetidos à modelo de ligadura e perfuração cecal. Divididos em 3 grupos: **CLP** – animais submetidos à sepse, sem tratamento; **SH** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram sacrificados e amostras de intestino coletadas. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM. * *p<0,05 vs* CLP; # *p<0,05 vs* SS; σ *p<0,05 vs* controle.

4.2.1.3 Estresse oxidativo na sepse experimental

O malondealdeído é produzido durante a peroxidação lipídica, sendo uma indicação de que está ocorrendo estresse oxidativo. Em 6h, nos grupos CLP, SS e SH não houve nenhuma alteração na concentração de malondealdeído em relação ao controle. Em 12h o grupo CLP apresentou um aumento da peroxidação lipídica em relação aos grupos controle, SS e SH (*p< 0,05*). Em 24h, em todos os grupos, a concentração de MDA manteve-se próximo dos valores basais (figura 9).

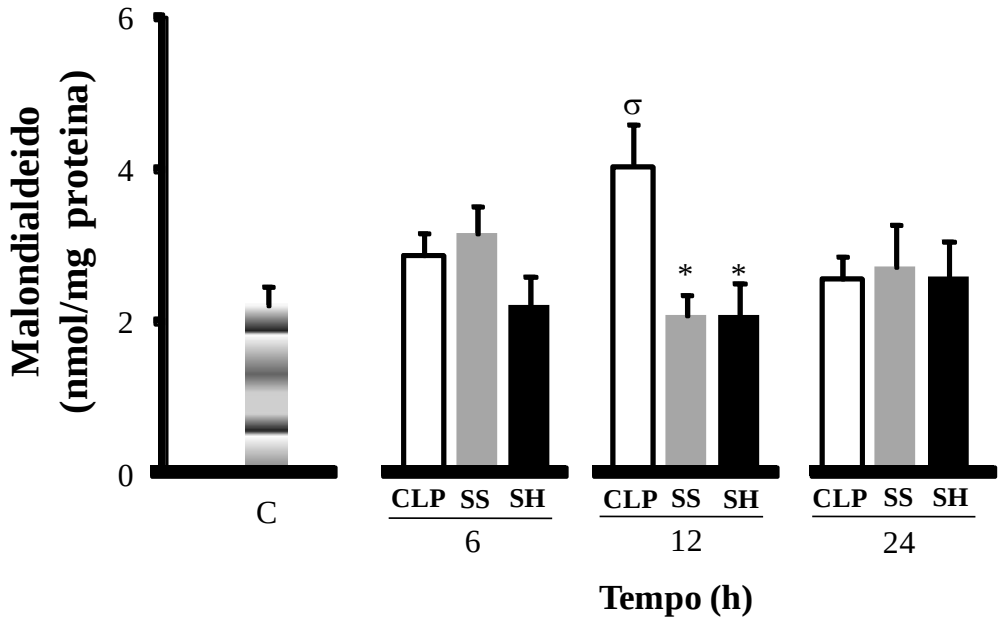

Figura 9 – Peroxidação lipídica no intestino

Concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foi dosada em camundongos Balb/c submetidos à modelo de ligadura e perfuração cecal. Divididos em 3 grupos: **CLP** – animais submetidos à sepse, sem tratamento; **SH** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram sacrificados e amostras de intestino coletadas. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM. * *p<0,05 vs* CLP; # *p<0,05 vs* SS; σ *p<0,05 vs* controle.

Outro indicador do estresse oxidativo é o óxido nítrico. Dosamos nitrito, um subproduto estável do NO. Após 6 horas da indução de sepse, no grupo CLP e SS não houve aumento em relação ao controle. Entretanto no grupo SH apresentou-se uma redução da produção de nitrito em relação ao grupo CLP *(p< 0,05*). Em 12h e 24h, nos grupos CLP, SS e SH, estudados nestes períodos, não houve aumento significativo de nitrito em relação com o grupo controle (figura 10).

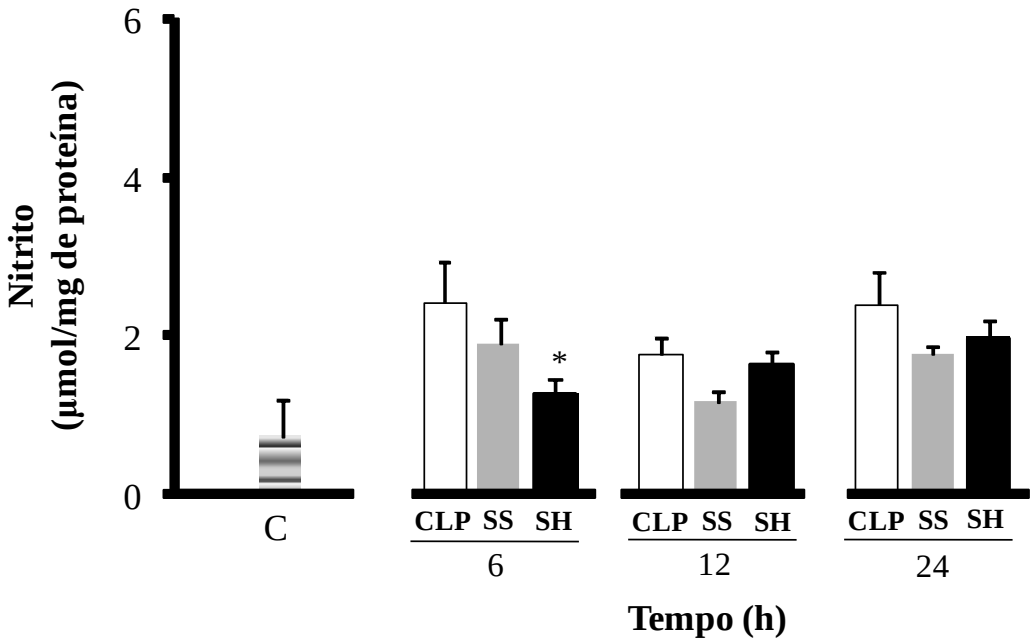

Figura 10 – Dosagem de Nitrito no intestino

Concentração de nitrito em camundongos Balb/c submetidos à modelo de ligadura e perfuração cecal. Divididos em 3 grupos: **CLP** – animais submetidos à sepse, sem tratamento; **SH** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram sacrificados e amostras de intestino coletadas. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM. * *p<0,05 vs* CLP; # *p<0,05 vs* SS; σ *p<0,05 vs* controle.

4.2.2 Lavado peritoneal

Contagem de neutrófilos no peritônio

Para analisar a infiltração de neutrófilos no foco infeccioso realizamos contagem diferencial de células. Em 6h, nos grupos CLP, SS e SH houve uma tendência em aumentar o numero de neutrófilos em relação ao grupo controle, que não foi confirmada estatisticamente. Em 12h o grupo CLP mostrou aumento de neutrófilos em comparação com controle *($p< 0,05$)*. O grupo SS reduziu estas células em relação ao grupo CLP *($p< 0,05$)*. E o grupo SH aumentou o número de neutrófilos no peritônio em relação aos grupos controle e SS *($p< 0,05$)*. Em 24h não houve nenhuma diferença entre os grupos, apenas uma tendência no grupo SH em reduzir neutrófilos em relação aos grupos CLP e SS (figura 11).

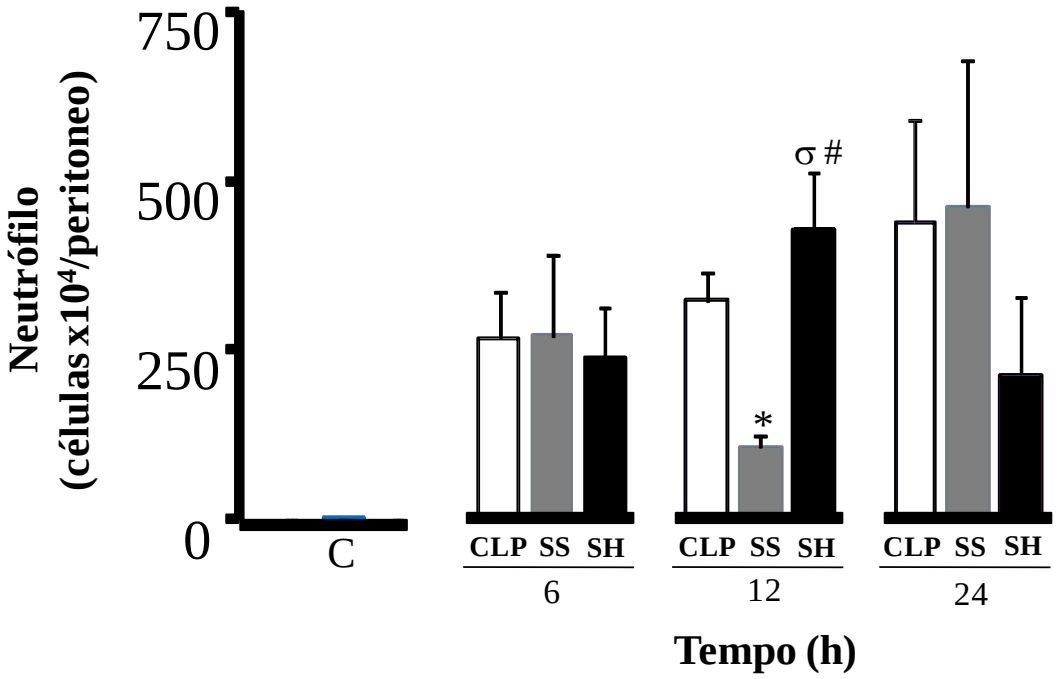

Figura 11 – Contagem de neutrófilos no lavado peritoneal

O número absoluto de neutrófilos foi contado no lavado peritoneal de camundongos Balb/c submetidos à modelo experimental de sepse polimicrobiana. Divididos em 3 grupos: **CLP** – no qual os animais foram induzidos à sepse, através do modelo de ligadura e perfuração cecal; **SH** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram sacrificados, e amostras de lavado peritoneal coletadas para contagem total de neutrófilos. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM. * *p<0,05 vs* CLP; # *p<0,05 vs* SS; σ *p<0,05 vs* controle.

4.3 Resposta inflamatória no pulmão

4.3.1 Infiltração de neutrófilos no tecido

Para avaliar os efeitos da SH no recrutamento de neutrófilos para o pulmão após indução de sepse, foi dosado concentração de mieloperoxidase. Em 6h e 12h, nos grupos CLP, SS e SH houve aumento de neutrófilos no pulmão em relação ao grupo controle *($p < 0,05$)*. Entretanto em 24h, nos grupos CLP e SS os neutrófilos mantiveram-se aumentados em relação ao controle, diferentemente do grupo SH, que reduziu o número de neutrófilos no pulmão em relação ao grupo CLP *($p < 0,05$)* (figura 12a).

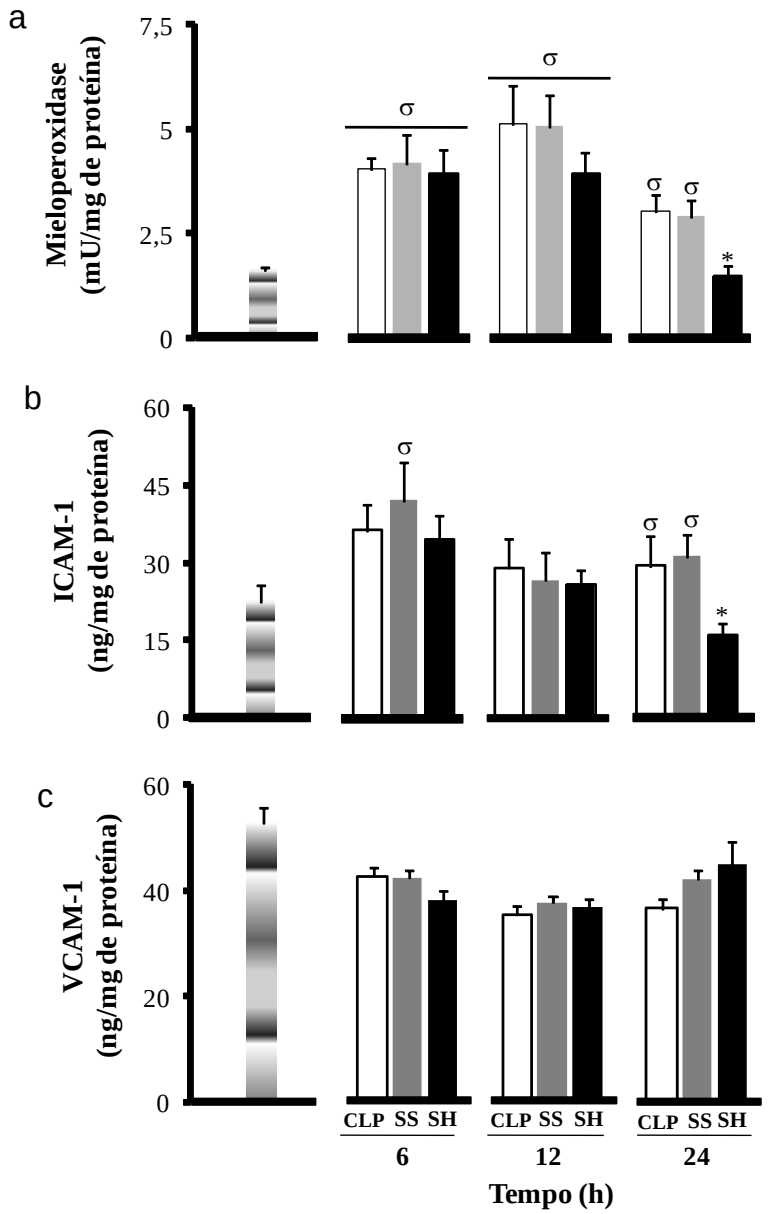

Figura 12 – Infiltrado de neutrófilos no pulmão.

Concentração de (a) mieloperoxidase, (b) ICAM-1 e (c) VCAM-1 foram dosadas em camundongos Balb/c submetidos à modelo de ligadura e perfuração cecal. Divididos em 3 grupos: **CLP** – animais submetidos à sepse, sem tratamento; **SH** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram sacrificados e amostras de intestino coletadas. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM. * *p<0,05 vs* CLP; # *p<0,05 vs* SS; σ *p<0,05 vs* controle.

- Moléculas de adesão

Para análise do mecanismo pelo qual a SH reduz infiltração de neutrófilos, dosou-se concentração de moléculas de adesão, VCAM-1 e ICAM-1. Após 6h, no grupo CLP e SH não apresentaram aumento significativo de produção de ICAM-1 em relação ao controle, diferentemente do que se observou no grupo SS, que aumentou a produção desta molécula em relação ao controle *(p< 0,05*). Em 12h os grupos CLP, SS e SH não apresentaram aumento significativo de ICAM-1 em relação ao controle *(p< 0,05*). Entretanto em 24h os grupos CLP e SS aumentaram a produção de ICAM-1 em relação ao controle *(p< 0,05*). Enquanto que o grupo SH reduziu a quantidade desta molécula no pulmão em relação ao grupo CLP *(p< 0,05*) (figura 12b).

Quanto à expressão de VCAM-1, observou-se que não houve nenhuma alteração entre os grupos, nos períodos estudados (figura 12c).

Realizou-se também análise histológica qualitativa nos pulmões dos animais em todos os grupos. Em 6h os grupos tratados com SS e SH apresentaram septos mais espessos que no grupo controle e CLP (figura 13). Outro fator observado é a localização de ICAM-1 nos septos alveolares nos grupos SS e SH. Em 12h observamos presença de septos mais espessos nos grupos CLP e SS, diferente do apresentado nos grupos tratado com SH e controle (figura 14). Em todos os grupos a marcação para ICAM-1 esta presente nos septos alveolares. Em 24h observamos um aumento no espessamento dos septos alveolares no grupo SS, mas nos grupos CLP e SH não apresentaram aumento da espessura em relação ao

controle. ICAM-1, nos grupos CLP e SS esta localizada nos vasos e na parede do bronquíolo terminal, assim como nos septos alveolares. Já no grupo SH observou-se marcação para ICAM-1 apenas na parede dos vasos (figura 15).

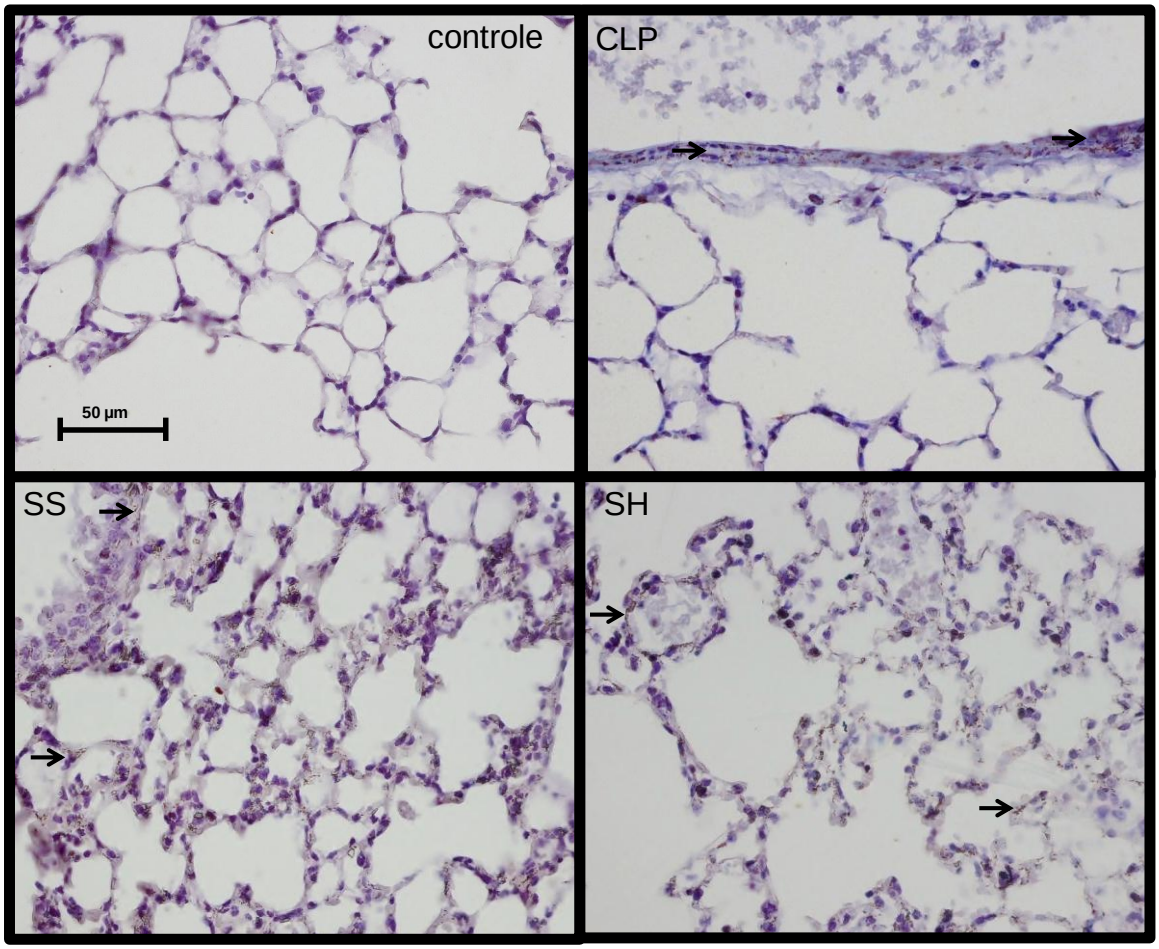

Figura 13 – Marcação de ICAM-1 no pulmão (6h)

Camundongos Balb/c submetidos à modelo experimental de sepse polimicrobiana. Divididos em 3 grupos: **CLP** – no qual os animais foram induzidos à sepse, através do modelo de ligadura e perfuração cecal; **SH** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h os animais foram sacrificados, e amostras de pulmão coletadas para realizar imunohistoquimica com marcação para ICAM-1. C**ontrole** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. (→) Marcação positiva de ICAM-1.

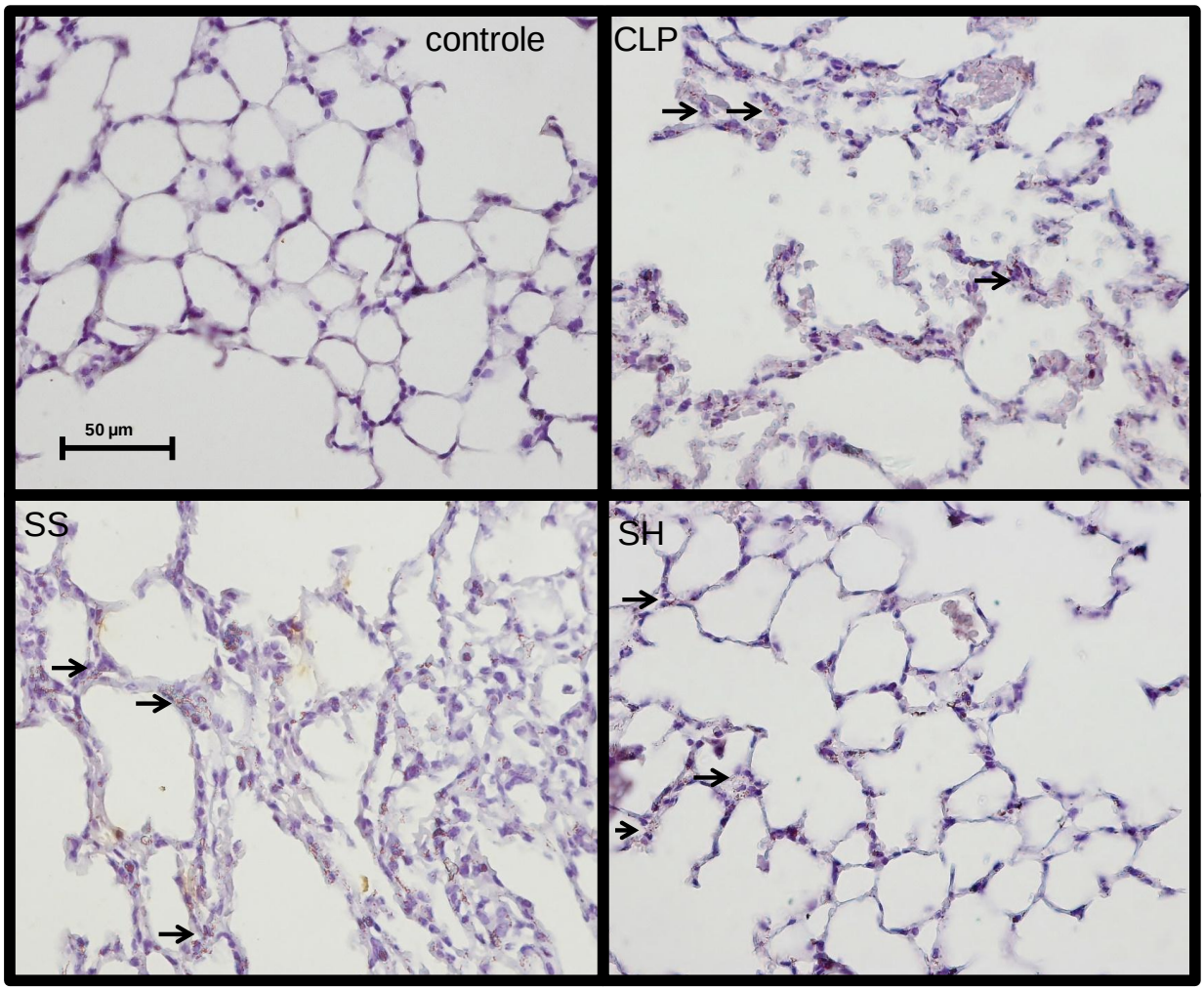

Figura 14 – Marcação de ICAM-1 no pulmão (12h)

Camundongos Balb/c submetidos à modelo experimental de sepse polimicrobiana. Divididos em 3 grupos: **CLP** – no qual os animais foram induzidos à sepse, através do modelo de ligadura e perfuração cecal; **SH** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 12h os animais foram sacrificados, e amostras de pulmão coletadas para realizar imunohistoquimica com marcação para ICAM-1. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. (→) Marcação positiva de ICAM-1.

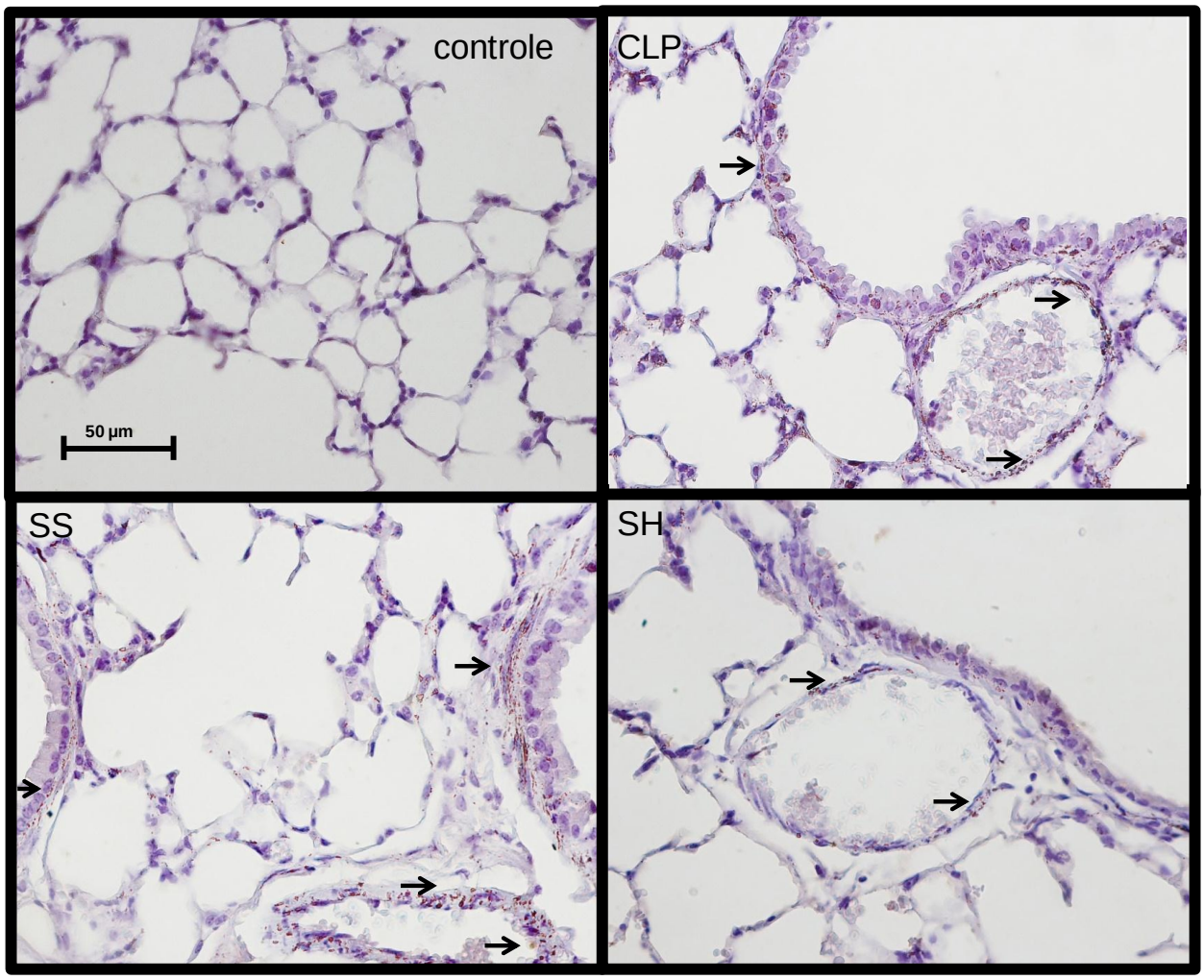

Figura 15 – Marcação de ICAM-1 no pulmão (24h)

Camundongos Balb/c submetidos à modelo experimental de sepse polimicrobiana. Divididos em 3 grupos: **CLP** – no qual os animais foram induzidos à sepse, através do modelo de ligadura e perfuração cecal; **SH** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP foram tratados intravenosamente com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 24h os animais foram sacrificados, e amostras de pulmão coletadas para realizar imunohistoquimica com marcação para ICAM-1. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. (→) Marcação positiva de ICAM-1.

- Quimiocina

A quimiotaxia é um importante evento que ocorre no recrutamento de neutrófilos. Sendo as quimiocinas responsáveis por atrair neutrófilos. Após indução de sepse, em 6h, os grupos CLP, SS e SH apresentaram maior concentração de CXCL-1 em relação ao controle *(p< 0,05*). Entretanto no grupo SH houve redução da concentração desta quimiocina em relação ao grupo CLP *(p< 0,05*). Em 12h os grupos CLP, SS e SH mostraram um aumento da produção de CXCL-1 em relação ao controle *(p< 0,05*). O grupo SH, entretanto apresentou concentração reduzida desta quimiocina em relação ao grupo CLP *(p< 0,05*). Em 24h os grupos CLP, SS e SH aumentaram a produção de CXCL-1 em relação ao controle *(p< 0,05*). Porém o grupo tratado com SH reduziu a produção desta quimiocina em relação ao grupo CLP *(p< 0,05*) (figura 16).

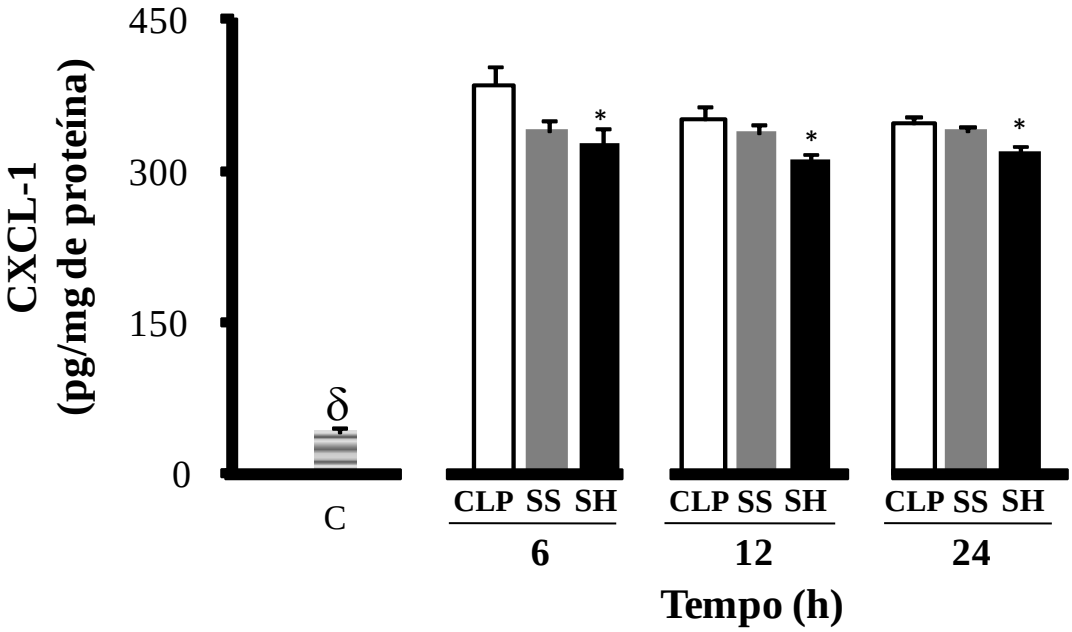

Figura 16 – Concentração de quimiocina no pulmão

Concentração de quimiocina CXCL-1 foi dosada em camundongos Balb/c submetidos à modelo de ligadura e perfuração cecal. Divididos em 3 grupos: **CLP** – animais submetidos à sepse, sem tratamento; **SH** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram sacrificados e amostras de pulmão coletadas. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM. * *p<0,05 vs* CLP; # *p<0,05 vs* SS; δ *p<0,05 vs* todos os outros grupos.

4.3.2 Perfil inflamatório durante sepse experimental

Para analisar o efeito da SH no perfil inflamatório foi induzido sepse, e os animais foram tratados com SS e SH. A produção de TNF-α, em 6h, no grupo CLP aumentou em 48,5% em relação ao grupo controle, mas não foi confirmado estatisticamente. Nos grupos SS e SH reduziu em 68,7 % a

concentração de TNF-α em comparação com o grupo CLP, entretanto não foi significativamente diferente. Em 12h, no grupo CLP não houve aumento da produção de TNF-α em relação ao controle. Entretanto no grupo SS houve um aumento da concentração de TNF-α, em relação ao grupo controle e CLP *(p< 0,05*). No grupo SH houve redução da produção desta citocina em comparação com o grupo SS *(p< 0,05*) (figura 17a).

A produção de IL-6, em 6h e 12h, no grupo CLP aumentou em relação ao grupo controle, assim como no grupo SS *(p< 0,05*). Entretanto no grupo SH houve redução da concentração de IL-6 em relação ao grupo CLP *(p< 0,05*). Em 24h houve aumento da produção desta interleucina nos grupos CLP em relação ao controle *(p< 0,05*). Entretanto nos grupos SS e SH mantiveram a produção de IL-6 próximo da concentração basal (figura 17b).

A produção de IL-10 em 6h não aumentou nos grupos CLP, SS e SH em relação ao controle. Em 12h, nos grupos CLP e SS não houve aumento da concentração desta citocina em comparação com o controle. Entretanto no grupo SH houve um aumento na produção de IL-10 em relação aos grupos controle, CLP e SS *(p< 0,05*). Em 24h os grupos CLP, SS e SH mantiveram a produção de IL-10 próximo da concentração basal (figura 17c).

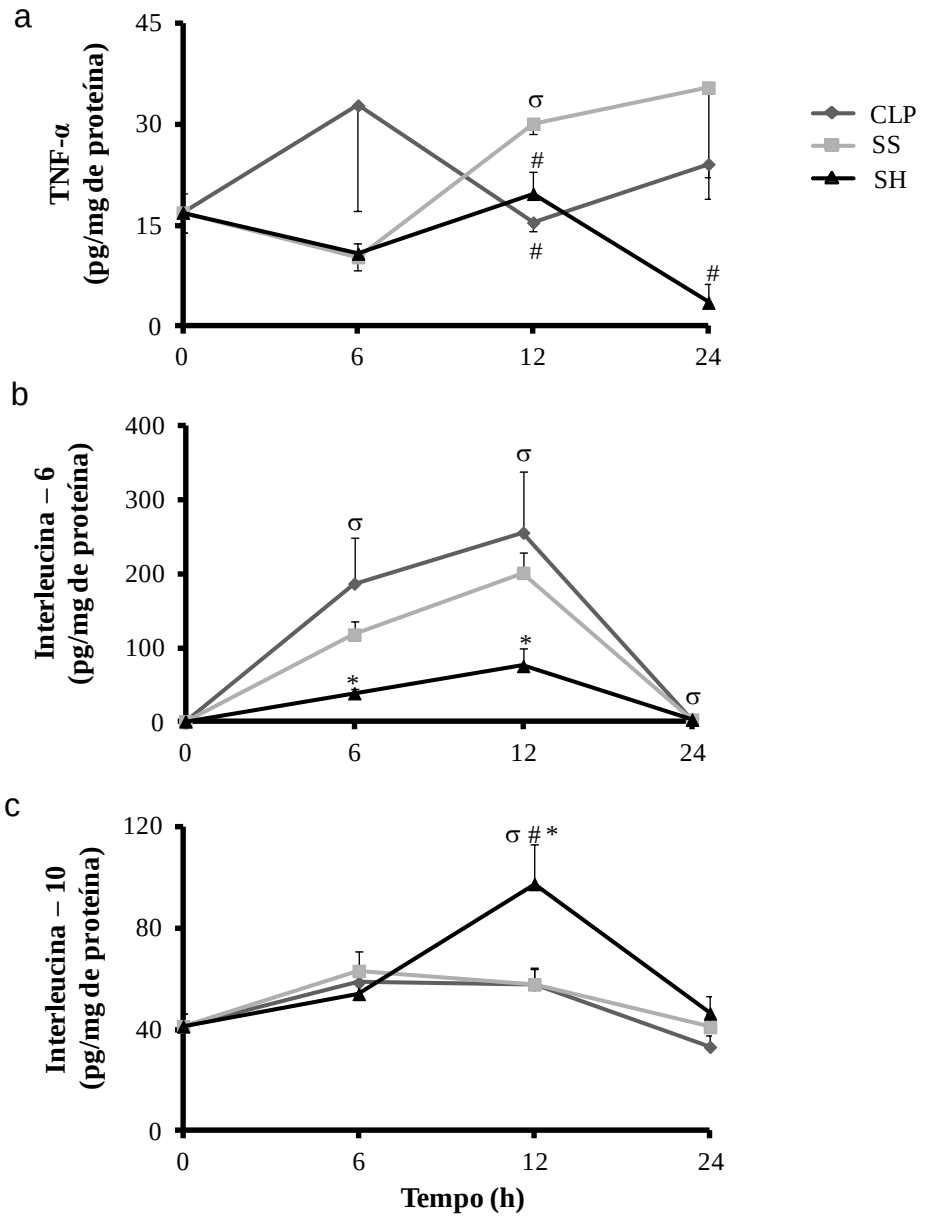

Figura 17 – Perfil inflamatório no pulmão

Concentração de citocinas pró-inflamatórias: TNF-α (a), IL-6 (b) e anti-inflamatória: IL-10 (c) foram dosadas em camundongos Balb/c submetidos à modelo de ligadura e perfuração cecal. Divididos em 3 grupos: **CLP** – animais submetidos à sepse, sem tratamento; **SH** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram sacrificados e amostras de pulmão coletadas. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM. * *p<0,05 vs* CLP; # *p<0,05 vs* SS; σ *p<0,05 vs* controle.

4.3.3 Estresse oxidativo na sepse experimental

Para analisar o estresse oxidativo dosou-se malondealdeído, um indicador da peroxidação lipídica. Em 6h no grupo CLP não houve um aumento significativo da concentração de MDA em comparação com o grupo controle. Entretanto, os grupos SS e SH reduziram a concentração de MDA em relação ao grupo CLP *(p< 0,05*). Em 12h e 24h todos os grupos mantiveram os valores próximos dos basais (figura 18).

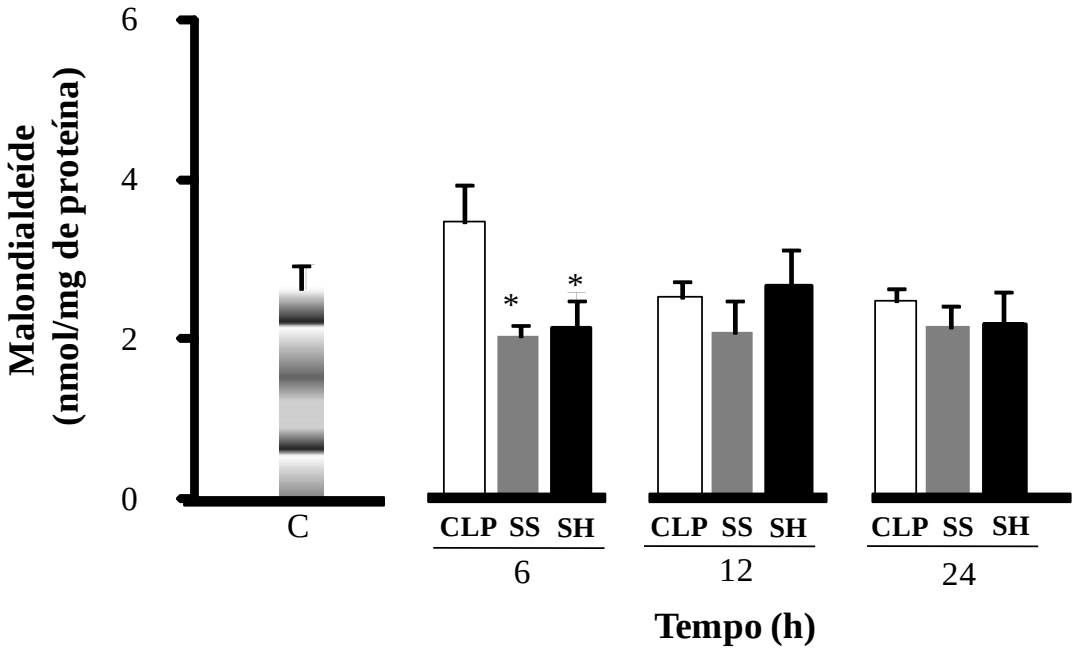

Figura 18 – Peroxidação lipídica no pulmão

Concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foi dosada em camundongos Balb/c submetidos à modelo de ligadura e perfuração cecal. Divididos em 3 grupos: **CLP** – animais submetidos à sepse, sem tratamento; **SH** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram sacrificados e amostras de intestino coletadas. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM.

* *p<0,05 vs* CLP.

Outro indicador do estresse oxidativo é o nitrito, em 6h e 12h os valores dos grupos CLP, SS e SH mantiveram-se próximos do basal. Em 24h nos grupos CLP e SS não houve aumento significativo em relação ao grupo controle. Entretanto o grupo SH reduziu a concentração de MDA em comparação com o grupo SS *(p< 0,05*) (figura 19).

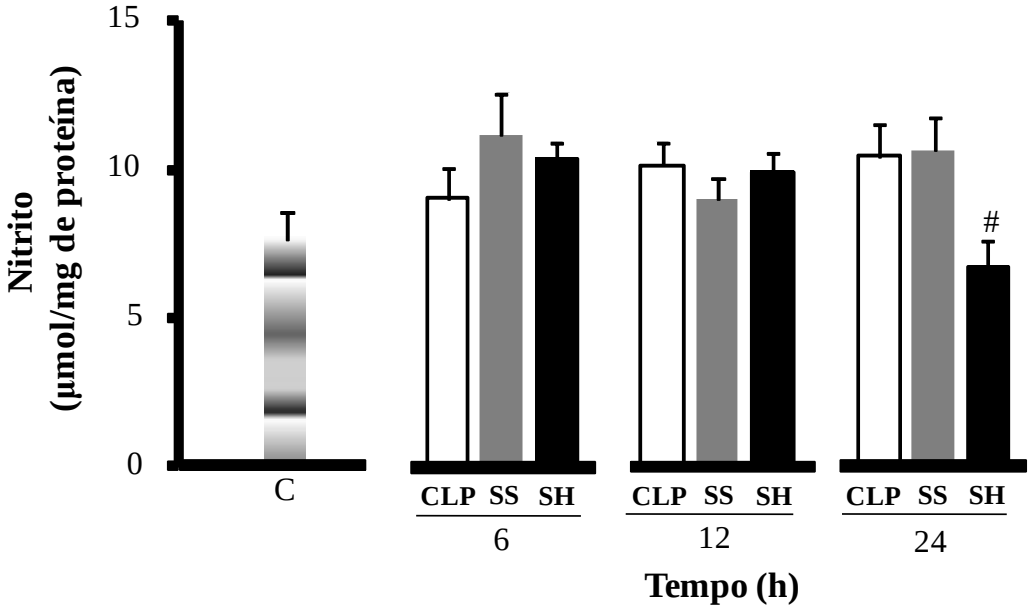

Figura 19 – Dosagem de Nitrito no pulmão

Concentração de nitrito camundongos Balb/c submetidos à modelo de ligadura e perfuração cecal. Divididos em 3 grupos: **CLP** – animais submetidos à sepse, sem tratamento; **SH** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg) e **SS** – 30 min. após CLP tratados i.v. com solução salina isotônica 0,9% (34 mL/kg). Após 6h, 12h e 24h os animais foram sacrificados e amostras de intestino coletadas. **C** – valores basais de animais não submetidos à CLP ou tratamento. Valores expressos em média ± EPM. * *p<0,05 vs* CLP; # *p<0,05 vs* SS.

5 DISCUSSÃO

Sepse é uma doença que resulta da resposta inflamatória sistêmica à infecção [5], apresentando alta taxa de mortalidade. No Brasil, dados do estudo BASES (Brazilian Sepsis Epidemological Study) mostram que sepse apresenta aproximadamente 34% de mortalidade, sepse grave 47% e choque séptico 52% [9]. A interação fisiopatológica da sepse e sua natureza sistêmica envolvem uma série de mediadores inflamatórios incluindo tipos celulares, tecidos e órgãos, dificultando o entendimento completo do mecanismo exato que contribui para alta taxa de mortalidade e morbidade, mesmo com os avanços nos estudos de mecanismos moleculares [95].

Outro aspecto importante são os altos custos gerados por essa doença em hospitais públicos e privados [9]. As intervenções terapêuticas são apenas um suporte aos pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico. Intervenções terapêuticas específicas, que podem prevenir ou reverter o quadro clínico e reduzir a alta taxa de mortalidade são urgentemente necessárias [63]. Nesse contexto, nossos resultados mostraram que animais tratados com solução salina hipertônica têm efeitos protetores no pulmão, além de reduzir a mortalidade em animais submetidos à sepse polimicrobiana.

A SH tem sido estudada como tratamento em modelo de 2-hit. Este modelo consiste na ressuscitação com SH após choque hemorrágico, antes

de um estimulo secundário, que normalmente é um processo infeccioso com injeção de bactérias ou LPS, ou não muito estudado, com CLP. Em um estudo, Coimbra *et al*, realizaram CLP após choque hemorrágico e reperfundiram os animais com SH, mostrando menor dano pulmonar e hepático [96]. Segundo Fernandes *et al*, ressucitação com SH apresenta efeitos anti-inflamatórios, como redução da inflamação no pulmão, após isquemia e reperfusão seguido de injeção de *E. coli* [97]. No presente estudo nós visamos estudar os mecanismos pelos quais a SH apresenta esses efeitos benéficos, em um modelo clinicamente relevante, de sepse polimicrobiana.

O modelo de ligadura e perfuração cecal causa peritonite, devido à contaminação contínua de bactérias na cavidade abdominal, e consequentemente evolui rapidamente para sepse. Esse modelo experimental apresenta um foco de infecção bem definido e os animais desenvolvem os sintomas típicos de sepse, com alta taxa de mortalidade. Desde a primeira descrição sobre o modelo de CLP, este tem sido extensivamente usado para induzir sepse experimental. No que diz respeito à sepse observada em seres humanos, o modelo de CLP é o que mais se assemelha ao quadro séptico de pacientes, caracterizada por um estado inicial hiperdinâmico e hipermetabólico, seguido de um estado hipodinâmico e hipometabólico [98].

Além da relevância clínica e do uso bem difundido nas pesquisas sobre sepse, CLP é um método simples e consistente. O resultado após CLP é fortemente associado com muitos fatores durante o procedimento que

estão diretamente relacionados com a mortalidade [99]. Os fatores que determinam a gravidade da sepse são: o comprimento da ligadura do ceco, o tamanho da agulha utilizada, o número de furos realizados, ressuscitação por fluidos e tratamento com antibiótico [98]. Em nosso estudo, os animais submetidos à CLP receberam reposição volêmica intravascular com solução salina fisiológica 0,9% e solução salina hipertônica 7,5%. Os animais apresentaram sobrevida de 33% no grupo CLP (sem nenhum tratamento) e a reposição volêmica reduziu a mortalidade. Os animais tratados com SS apresentaram 47% de sobrevida e os animais tratados com solução salina hipertônica apresentaram sobrevida de 60%.

As células do sistema imune participam do processo inflamatório eliminando diretamente microrganismos. Os neutrófilos são células importantes na imunidade inata, a primeira linha de defesa contra um desafio infeccioso [27, 35, 100]. Seu arsenal de proteases e espécies reativas de oxigênio os faz muito eficientes em eliminar bactérias, mas essas mesmas defesas podem também levar ao dano tecidual do hospedeiro [101, 102].

5.1 Resposta inflamatória na cavidade abdominal

Nosso estudo demonstrou que animais tratados com SH apresentaram aumento da infiltração de neutrófilos no intestino em 6h, sustentando uma redução na infiltração neutrofílica tardiamente.

O foco infeccioso do nosso modelo de sepse localiza-se na cavidade peritoneal e avaliamos se houve uma efetiva migração de neutrófilos para

combate das bactérias. No lavado peritoneal há um aumento de neutrófilos em 12h, no grupo SH em comparação com SS. Estudos demonstram que quando há falha na migração de neutrófilos para o sítio de infecção, há uma correlação direta com mortalidade na sepse grave [35]. Frente a isso, o aumento da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, observado em nosso estudo no grupo SH, beneficia o direcionamento adequado da resposta inflamatória ao sítio infeccioso, característica de uma resposta imune bem sucedida, evidenciada na redução da mortalidade. A migração de neutrófilos controla o crescimento bacteriano e consequentemente previne a disseminação destas e o óbito [30].

O recrutamento de neutrófilos é mediado por moléculas de adesão, como: selectinas, integrinas [36] e superfamília de imunogloblinas. ICAM-1 e VCAM-1 são expressas constitutivamente em células endoteliais *in vitro* e *in vivo*. Entretanto a expressão de ICAM-1 pode ser aumentada devido à variedade de mediadores inflamatórios, como TNF-α e endotoxinas [36]. ICAM-1 é uma molécula de adesão importante no recrutamento de neutrófilos. No intestino, nossos resultados mostraram que produção de ICAM-1 no grupo SH foi mantida próxima das concentrações basais. Após 6h de indução de sepse, houve aumento da infiltração de neutrófilos, que não foi seguida pela elevação de ICAM-1. Por outro lado o grupo SS apresentou aumento da concentração de ICAM-1 em 6h, 12h e 24h, embora a infiltração de neutrófilos não se altere em nenhum dos períodos. Esses dados sugerem uma ausência de correlação, neste caso, entre o aumento da infiltração de neutrófilos e a expressão dessa molécula. O mesmo

observou-se com a produção de CXCL-1, uma quimiocina envolvida no processo de recrutamento de neutrófilos.

Após interação inicial com microorganismos há ativação da resposta imune inata, a fim de eliminar o organismo invasor ou o próprio tecido. O processo inflamatório é necessário para uma defesa eficaz, que consiste na liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1, IL-6 [5, 103]. Entretanto, quando essa ativação é excessiva, pode levar à disfunção múltipla de órgãos e ao óbito [10, 104]. O efeito subsequente, e às vezes concomitante, é a liberação de mediadores anti-inflamatórios como citocinas (IL-10, IL-4, IL-13 e TGF-β) [103]. Ainda no intestino, nossos resultados mostraram que grupo SH apresentou redução da produção de TNF-α e IL-6, mas não alterou a concentração de IL-10 tardiamente, comparado com grupo SS e CLP. Contudo, a administração da solução hipertônica acarretou uma significativa redução da mortalidade.

A sepse está associada ao aumento da expressão da iNOS. Diversos trabalhos afirmam que a transcrição de iNOS pode ser induzida por citocinas, como TNF-α [10]. A interação do NO com superóxido, formando peroxinitrito [63], é uma reação rápida e depende da disponibilidade e compartimentalização desses radicais. Alguns estudos demonstram que peroxinitrito é citotóxico e pode induzir tanto necrose quanto apoptose, podendo também induzir dano tecidual e falência múltipla de órgãos [105]. Neste estudo observamos no intestino que o tratamento com solução salina hipertônica mantém os valores basais de peroxidação lipídica e nitrito nas primeiras horas (até 12 horas).

Uma das hipóteses estudadas para explicar o desenvolvimento do estado séptico, que pode evoluir para síndrome da falência múltipla de órgãos (MODS), é a “hipótese do intestino”. Esta teoria propõe que danos no intestino resultam em uma sequência de eventos que inicia SIRS no hospedeiro, consequentemente desenvolvendo a síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS) e MODS [106]. No modelo de CLP além da perfuração cecal, que causa extravazamento de bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram- negativas, decorre-se a necrose no ceco.

Sabe-se que sepse pode evoluir para MODS, na qual os danos ou falência dos órgãos não estão diretamente envolvidos no processo original da doença. Embora a sequência de órgãos que podem falhar seja variável, o pulmão é geralmente o primeiro órgão acometido durante a sepse, sendo a falência pulmonar uma das principais causas de mortalidade durante a doença [106].

5.2 Resposta inflamatória no pulmão

A sepse grave é caracterizada pela falha na migração de neutrófilos para o foco primário de infecção e o acúmulo destas células em órgãos distantes, resultando em disfunção de órgãos e morte [5, 33]. O pulmão, que é um órgão à distância e apresentou redução da infiltração de neutrófilos no grupo SH após 6h e 12h em relação ao grupo CLP. Em 24h, essa proteção mostrou-se significativa, confirmando proteção efetiva contra dano pulmonar devido à ação neutrofílica.

A quimiocina CXCL-1 está envolvida no processo de quimiotaxia de neutrófilos. O presente estudo mostrou um aumento significativo desta quimiocina em todos os grupos nos períodos estudados, em relação ao grupo controle. Entretanto, somente o grupo que recebeu reposição volêmica com solução salina hipertônica apresentou menor concentração desta quimiocina em comparação com o grupo séptico que recebeu nenhum tipo de tratamento. Esse resultado indica que o motivo da redução do número de neutrófilos no pulmão, pelo grupo tratado com SH, seja causado pela interação célula endotelial – neutrófilos, uma vez que houve redução de moléculas de adesão em detrimento da permanência do aumento da produção de quimiocina.

Como dito anteriormente, a molécula de adesão ICAM-1 está expressa constitutivamente nas células endoteliais. Entretanto quando ocorre infecção, a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas (TNF-α e IL-1), assim como, o próprio LPS, podem aumentar a expressão destas moléculas [33]. O grupo SH apresentou redução de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6, reduzindo consequentemente a concentração de ICAM-1, como observado 24h após a indução de CLP, havendo assim menor número de neutrófilos infiltrados no tecido no mesmo período. Esses dados podem indicar que o motivo dessa redução de neutrófilos seja a diminuição de moléculas de adesão.

A liberação de grandes quantidades de mediadores pró-inflamatórios pode ativar uma resposta inflamatória desregulada, resultando em danos para os tecidos. A liberação excessiva de mediadores anti-inflamatórios

pode contribuir para imunossupressão e anergia, o que ocorre na sepse observada em humanos [98]. No choque hemorrágico a SH inibe a expressão de TNF-α e aumenta a de IL-10 em macrófagos alveolares [107]. Nesse estudo, o grupo SH não reduziu completamente as vias pró-inflamatórias, e aumentou a concentração de IL-10, diferente dos grupos SS e CLP, mantendo o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias. Promovendo assim a eliminação das bactérias, mantendo eficaz a habilidade do hospedeiro em lutar contra bactérias.

O padrão complexo da produção de citocinas é muito estudado na sepse. No pulmão, as principais citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6, tem se mostrado aumentadas após indução de sepse por CLP [98], como também observado em nosso estudo. Além disso, tem sido demonstrado em estudos que altas concentrações de IL-6 estão fortemente relacionadas com a mortalidade após indução de sepse por CLP [108-110]. SH reduziu a produção de IL-6 no pulmão, comparado com o grupo CLP, assim como redução da mortalidade. O grupo SH obteve sobrevida de 60% quando comparado com 33% no grupo CLP e 47% no grupo SS, podendo haver uma correlação entre a redução da mortalidade e a produção de IL-6, uma vez que a administração de SH aumentou a sobrevida em 13% e 27% comparado aos grupos SS e CLP, respectivamente.

Em condições fisiológicas o NO age como importante sequestrador de EROs, limitando a toxicidade associada com estes radicais, como superóxido (O_2^-). Consequentemente esse mecanismo inibe a agregação plaquetária e adesão de leucócitos a células endoteliais [111]. Nos

macrófagos, e neutrófilos o propósito biológico do NO e dos seus produtos é conter e eliminar o organismo invasor. Entretanto, NO também pode ter efeitos citotóxicos. Quando o NO reage com superóxido, por exemplo, durante a sepse, forma produtos como peroxinitrito, um potente oxidante. Este radical reage com lipídios, causando peroxidação lipídica. Podemos observar no presente estudo uma redução da produção de MDA no grupo SH. A reação NO + O_2^- também pode formar dióxido de nitrogênio (NO_2), que em solução aquosa forma ácido nítrico e nitroso, e consequentemente nitrito e nitrato. Estas moléculas também estão aumentadas durante a sepse [111]. A formação de nitrito foi aumentada após a indução de sepse, porém observamos uma redução no grupo SH. Ambos os resultados observados, a redução de nitrito e MDA, indicam uma redução de danos causados no tecido por causa do estresse oxidativo.

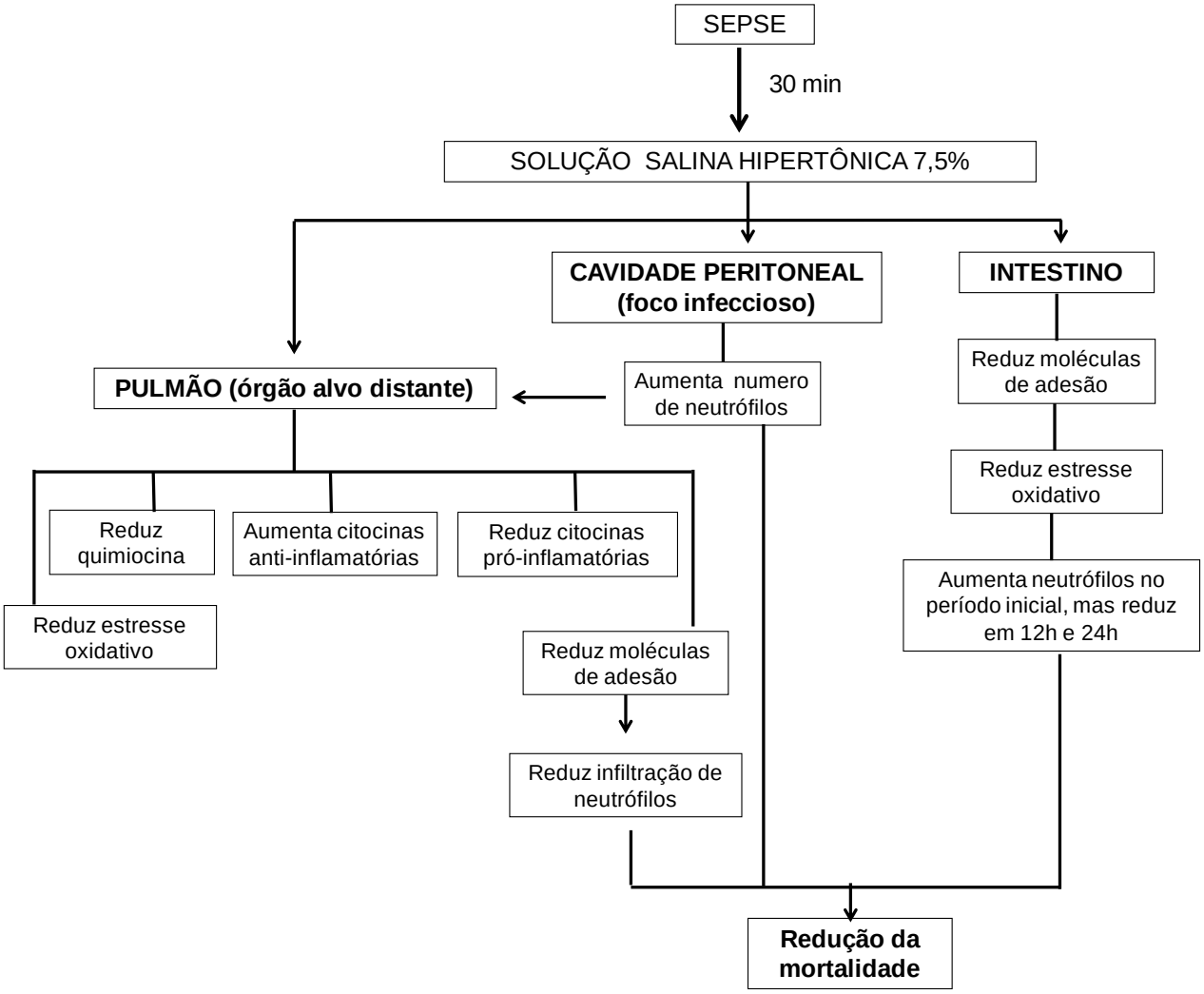

Figura 20 – Efeitos da solução salina hipertônica 7,5% em camundongos submetidos à sepse experimental através do modelo de ligadura e perfuração cecal, no presente estudo.

Infusão de volume é uma medida terapêutica necessária em pacientes sépticos. Pacientes com sepse apresentam extravasamento de volume para o espaço intersticial e instabilidade hemodinâmica. Entretanto,

reposição com grande quantidade de volume pode induzir edema pulmonar intersticial e pode aumentar pressão intra-abdominal. Acúmulo de água no pulmão exacerba a falência respiratória levando à necessidade de ventilação mecânica. Pressão abdominal aumentada reduz retorno venoso, diminuindo o rendimento cardíaco, e reduzindo perfusão, produzindo assim dano tecidual. Estes resultados demonstram a relevância de se estudar pequenos volumes para infusão, como alternativa para tratar pacientes sépticos. Nossos resultados (figura 20) corroboram com um estudo publicado recentemente, onde pacientes com choque séptico, obtiveram melhoras com o uso de solução salina hipertônica no tratamento desta doença em relação à reposição com solução salina [94], além de sugerir um mecanismo de ação.

6 CONCLUSÃO

O modelo de CLP foi efetivo em induzir sepse, tendo em vista a produção de mediadores inflamatórios elevados em comparação com o grupo controle. A SH modula a resposta inflamatória em modelo experimental de sepse polimicrobiana, além de melhorar a sobrevida (de 33% para 60%). No foco infeccioso, a SH aumentou a capacidade do hospedeiro na eliminação das bactérias, considerando o aumento do número de neutrófilos na cavidade abdominal. No intestino, a SH reduz o estresse oxidativo, assim como a resposta inflamatória. No intestino não se observou uma correlação entre a infiltração de neutrófilos, moléculas de adesão e quimiotaxia, considerando que houve um aumento de ICAM-1 e CXCL-1, mas redução de neutrófilos. Um fator importante é que a SH também protegeu o pulmão, pois aumentou citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, e reduziu citocinas pró-inflamatória, como IL-6 e TNF-α. Corroborando, reduziu a infiltração de neutrófilos, através da redução de moléculas de adesão, mas não de quimiocinas (CXCL-1). Além de reduzir peroxidação lipídica e produção de nitrito, concluindo-se que houve diminuição no estresse oxidativo. Com os resultados descritos acima, principalmente no pulmão e lavado peritoneal, a ressucitação com SH apresenta um potencial imunomodulatório eficaz. Podendo considerar a SH como uma forma de intervenção terapêutica para sepse.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Geroulanos SD, ET. : Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive care medicine* 2006, 32(12):2077.
2. Funk DJ PJ, Kumar A.: Sepsis and septic shock: a history. *Critical care clinics* 2009, 25(1):83-101.
3. Vincent JL AE: The last 100 years of sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006, 173(3):256-263.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992, 101(6):1644-1655.
5. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002, 420(6917):885-891.
6. Pinheiro da Silva F, Velasco I: *Sepse*, 1ª ed; Barueri, SP: Manole 2007.
7. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE: Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scandinavian journal of immunology* 2009, 69(6):479-491.
8. V K: Mediators of systemic inflammatory response syndrome and the role of recombinant activated protein C in sepsis syndrome. *Infectious disease clinics of North America* 2011, 25(4):835-850.
9. Silva E PMA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E; Brazilian Sepsis Epidemiological Study.: Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Critical care (London, England)* 2004, 8(4):251-260.
10. Nduka OO, Parrillo JE: The pathophysiology of septic shock. *Critical care clinics* 2009, 25(4):677-702, vii.
11. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R *et al*: Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive care medicine* 2002, 28(2):108-121.
12. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States:

analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001, 29(7):1303-1310.

13. Rittirsch D FM, Ward PA.: Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature reviews Immunology* 2008, 8(10):776-787.
14. Opal SM HC: Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock. *Critical care (London, England)* 2002, 6(2):125-136.
15. Majcherczyk PA, Langen H, Heumann D, Fountoulakis M, Glauser MP, Moreillon P: Digestion of Streptococcus pneumoniae cell walls with its major peptidoglycan hydrolase releases branched stem peptides carrying proinflammatory activity. *The Journal of biological chemistry* 1999, 274(18):12537-12543.
16. Morath S, Geyer A, Hartung T: Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus. *The Journal of experimental medicine* 2001, 193(3):393-397.
17. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999, 11(4):443-451.
18. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Imunologia celular e molecular, sexta ed; tradução de Claudia Reali; Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
19. Van Amersfoort ES VBT, Kuiper J.: Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical microbiology reviews* 2003, 16(3):379-414.
20. Kopp EB, Ghosh S: NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 1995, 58:1-27.
21. Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994, 12:141-179.
22. Chang CK, Albarillo MV, Schumer W: Therapeutic effect of dimethyl sulfoxide on ICAM-1 gene expression and activation of NF-kappaB and AP-1 in septic rats. *J Surg Res* 2001, 95(2):181-187.
23. Chang CK, Llanes S, Schumer W: Inhibitory effect of dimethyl sulfoxide on nuclear factor-kappa B activation and intercellular adhesion molecule 1 gene expression in septic rats. *J Surg Res* 1999, 82(2):294-299.
24. Penner CG, Gang G, Wray C, Fischer JE, Hasselgren PO: The transcription factors NF-kappab and AP-1 are differentially regulated in skeletal muscle during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 281(5):1331-1336.
25. Oliveira RP, Velasco I, Soriano FG, Friedman G: Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Critical Care medicine* 2002, 6(5):418-423.
26. Nystrom PO: The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1998, 41 Suppl A:1-7.

27. Reddy RC, Standiford TJ: Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Current opinion in hematology* 2010, 17(1):18-24.
28. J.A. Lederer MLR, J.A. Mannick,: The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999, 11:153 -159.
29. Kovach MA ST: The function of neutrophils in sepsis. *Current opinion in infectious diseases* 2012, 25(3):321-327.
30. Freitas A A-FJ, Victoni T, Secher T, Lemos HP, Sônego F, Cunha FQ, Ryffel B.: IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *The journal of immunology* 2009, 182(12):7846-7854.
31. Junqueira LC, Carneiro J: Biologia celular e molecular, sétima ed; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000.
32. Sadik CD KN, Luster AD.: Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in immunology* 2011, 32(10):452-460.
33. Alves-Filho JC SF, Cunha FQ: Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock* 2010, 34 (Suppl 1):15-21.
34. Seely AJ PJ, Christou NV.: Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Critical care (London, England)* 2003, 7(4):291-307.
35. Alves-Filho J, de Freitas A, Spiller F, Souto F, Cunha F: The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 2008, 30 Suppl 1:3-9.
36. Albelda S, Smith C, Ward P: Adhesion molecules and inflammatory injury. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1994, 8(8):504-512.
37. Laudanna C KJ, Constantin G, Butcher E.: Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological reviews* 2002, 186:37-46.
38. Pinheiro da Silva F, Soriano F: Neutrophils recruitment during sepsis: Critical points and crossroads. *Frontiers in Bioscience* 2009, 14:4464-4476.
39. Y K: The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in Bioscience* 2008, 1(13):2400-2407.
40. Y. K: Neutrophil infiltration and chemokines. *Critical reviews in immunology* 2006, 26(4):307-316.
41. CA. D: Historical insights into cytokines. *European journal of immunology* 2007, 37 (Suppl 1):S34-45.
42. Matsuda N HY: Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *Journal of pharmacological sciences* 2006, 101(3):189-198.
43. Ulloa L TK: The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends in molecular medicine* 2005, 11(2):56-63.
44. Cavaillon JM AD: Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *Journal of endotoxin research* 2006, 12(3):151-170.

45. Bendtzen K: Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett* 1988, 19(3):183-191.

46. Sorkine P, Szold O, Halpern P, Gutman M, Greemland M, Rudick V, Goldman G: Gut decontamination reduces bowel ischemia-induced lung injury in rats. *Chest* 1997, 112(2):491-495.

47. Cicalese L, Billiar TR, Rao AS, Bauer AJ: Interaction between ischemia/reperfusion-induced leukocyte emigration and translocating bacterial enterotoxins on enteric muscle function. *Transplant Proc* 1997, 29(3):1815.

48. Kishimoto T AS, Taga T.: Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science (New York, NY)* 1992, 258(5082):593-597.

49. Casey LC BR, Bone RC.: Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Annals of internal medicine* 1993, 119(8):771-778.

50. Riedemann NC NT, Guo RF, Bernacki KD, Laudes IJ, Sarma JV, Lambris JD, Ward PA.: Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *Journal of immunology* 2003, 170(1):503-507.

51. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR: Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993, 11:165-190.

52. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S: Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993, 177(4):1205-1208.

53. Rongione AJ, Kusske AM, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW: Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis. *J Surg Res* 1997, 70(2):107-112.

54. Lyons A, Kelly JL, Rodrick ML, Mannick JA, Lederer JA: Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann Surg* 1997, 226(4):450-458; discussion 458-460.

55. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991, 147(11):3815-3822.

56. Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS, Jr.: Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 1999, 274(45):31868-31874.

57. Kohen R NA: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologyc phatology* 2002, 30(6):620-650.

58. Niedbala W CB, Liu H, Pitman N, Chang L, Liew FY.: Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40. *PNAS* 2007, 104(39):15478-15483.

59. silva FPd, Velasco I: Sepse, 1ª edn. Barueri - SP: Manole Ltda; 2007.

60. Naseem KM, Bruckdorfer KR: Hydrogen peroxide at low concentrations strongly enhances the inhibitory effect of nitric oxide on platelets. *Biochem J* 1995, 310 (Pt 1):149-153.

61. Brune B, Mohr S, Messmer UK: Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1996, 127:1-30.

62. Tada Y, Mori T, Shinogi T, Yao N, Takahashi S, Betsuyaku S, Sakamoto M, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y *et al*: Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mol Plant Microbe Interact* 2004, 17(3):245-253.

63. Soriano FG, Lorigados CB, Pacher P, Szabo C: Effects of a potent peroxynitrite decomposition catalyst in murine models of endotoxemia and sepsis. *Shock* 2011, 35(6):560-566.

64. Allen R: Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation. *Age* 1998, 21:47-76.

65. Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M, Jr., Lopes OU: Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *The American journal of physiology* 1980, 239(5):H664-673.

66. Kien ND, Antognini JF, Reilly DA, Moore PG: Small-volume resuscitation using hypertonic saline improves organ perfusion in burned rats. *Anesthesia and analgesia* 1996, 83(4):782-788.

67. Nakayama S, Kramer GC, Carlsen RC, Holcroft JW: Infusion of very hypertonic saline to bled rats: membrane potentials and fluid shifts. *The Journal of surgical research* 1985, 38(2):180-186.

68. Rocha e Silva M, Velasco IT, Nogueira da Silva RI, Oliveira MA, Negraes GA: Hyperosmotic sodium salts reverse severe hemorrhagic shock: other solutes do not. *The American journal of physiology* 1987, 253(4 Pt 2):H751-762.

69. Velasco IT, Rocha e Silva M, Oliveira MA, Silva RI: Hypertonic and hyperoncotic resuscitation from severe hemorrhagic shock in dogs: a comparative study. *Crit Care Med* 1989, 17(3):261-264.

70. Walsh JC, Zhuang J, Shackford SR: A comparison of hypertonic to isotonic fluid in the resuscitation of brain injury and hemorrhagic shock. *The Journal of surgical research* 1991, 50(3):284-292.

71. Rocha-e-Silva M, Poli de Figueiredo LF: Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics* 2005, 60(2):159-172.

72. Junger WG LF, Loomis WH, Hoyt DB: Hypertonic saline enhances cellular immune function. *Circ Shock* 1994, 42(4):190-196.

73. Kien ND RJ, White DA, Wu CH, Eisele JH: Cardiac contractility and blood flow distribution following resuscitation with 7.5% hypertonic saline in anesthetized dogs. *Circ Shock* 1991, 35(2):109-116.

74. Mazzoni MC WK, Arfors KE, Skalak TC: Capillary hemodynamics in hemorrhagic shock and reperfusion: in vivo and model analysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 1994, 267(5 Pt 2):H1928-1935.

75. Mouren S DS, Mion G, Souktani R, Fellahi JL, Arthaud M, Baron JF, Viars P: Mechanisms of increased myocardial contractility with hypertonic saline solutions in isolated blood-perfused rabbit hearts. *Anesthesia and analgesia* 1995, 81(4):777-782.

76. OD R: Novel strategies for immunomodulation after trauma: revisiting hypertonic saline as a resuscitation strategy for hemorrhagic shock. *The Journal of trauma* 2000, 49(4):580-583.

77. Rizoli SB KA, Fan J, Li YH, Marshall JC, Rotstein OD: Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *J Immunol* 1998, 161(11):6288-6296.

78. Kramer G, Elgjo G, Poli de Figueiredo LF, Wade C: HYPEROSMOTIC-HYPERONCOTIC SOLUTIONS. *Clinical Anesthesiology* 1997, 11:147-160.

79. Rizoli SB, Kapus A, Fan J, Li YH, Marshall JC, Rotstein OD: Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *J Immunol* 1998, 161(11):6288-6296.

80. Powers KA, Woo J, Khadaroo RG, Papia G, Kapus A, Rotstein OD: Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock upregulates the anti-inflammatory response by alveolar macrophages. *Surgery* 2003, 134(2):312-318.

81. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001, 345(19):1368-1377.

82. Junger WG, Coimbra R, Liu FC, Herdon-Remelius C, Junger W, Junger H, Loomis W, Hoyt DB, Altman A: Hypertonic saline resuscitation: a tool to modulate immune function in trauma patients? *Shock* 1997, 8(4):235-241.

83. Oliveira RP, Velasco I, Soriano F, Friedman G: Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Crit Care* 2002, 6(5):418-423.

84. Rabinovici R, Yue TL, Krausz MM, Sellers TS, Lynch KM, Feuerstein G: Hemodynamic, hematologic and eicosanoid mediated mechanisms in 7.5 percent sodium chloride treatment of uncontrolled hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obstet* 1992, 175(4):341-354.

85. Loomis WH, Namiki S, Hoyt DB, Junger WG: Hypertonicity rescues T cells from suppression by trauma-induced anti-inflammatory mediators. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 281(3):C840-848.

86. Loomis WH, Namiki S, Ostrom RS, Insel PA, Junger WG: Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 2003, 278(7):4590-4596.

87. Coimbra R, Junger WG, Hoyt DB, Liu FC, Loomis WH, Evers MF: Hypertonic saline resuscitation restores hemorrhage-induced

immunosuppression by decreasing prostaglandin E2 and interleukin-4 production. *J Surg Res* 1996, 64(2):203-209.

88. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000, 343(1):37-49.
89. Ciesla DJ, Moore EE, Zallen G, Biffl WL, Silliman CC: Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything. *J Trauma* 2000, 48(3):388-395.
90. Pascual JL, Ferri LE, Seely AJ, Campisi G, Chaudhury P, Giannias B, Evans DC, Razek T, Michel RP, Christou NV: Hypertonic saline resuscitation of hemorrhagic shock diminishes neutrophil rolling and adherence to endothelium and reduces in vivo vascular leakage. *Ann Surg* 2002, 236(5):634-642.
91. Rosengren S, Henson PM, Worthen GS: Migration-associated volume changes in neutrophils facilitate the migratory process in vitro. *Am J Physiol* 1994, 267(6 Pt 1):C1623-1632.
92. Yada-Langui MM, Coimbra R, Lancellotti C, Mimica I, Garcia C, Correia N, Jr., Rocha e Silva M: Hypertonic saline and pentoxifylline prevent lung injury and bacterial translocation after hemorrhagic shock. *Shock* 2000, 14(6):594-598.
93. Friedman G, Silva E, Vincent JL: Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 1998, 26(12):2078-2086.
94. van Haren FM SJ, Boerma EC, La Pine M, Bahr M, Pickkers P, van der Hoeven JG: Hypertonic fluid administration in patients with septic shock: a prospective randomized controlled pilot study. *Shock* 2012, 37(3):268-275.
95. Song SO HJ, Peng ZY, Parker R, Kellum JA, Clermont G: Ensemble models of neutrophil trafficking in severe sepsis. . *Plos Computational biology* 2012, 8(3):e1002422.
96. Coimbra R HD, Junger WG, Angle N, Wolf P, Loomis W, Evers MF: Hypertonic saline resuscitation decreases susceptibility to sepsis after hemorrhagic shock. *The Journal of trauma* 1997, 42(4):602-606; discussion 606-607.
97. Fernandes CI LF, Godoy LC, Negri EM, Pontieri V, Moretti AI, Fernandes TR, Soriano FG, Velasco IT, Souza HP.: Treatment of hemorrhagic shock with hypertonic saline solution modulates the inflammatory response to live bacteria in lungs. *Brazilian Journal of medical and biological research* 2009, 42(10):892-901.
98. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA: The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of leukocyte biology* 2007, 81(1):137-143.
99. Buras JA HB, Sitkovsky M.: Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews Drug discovery* 2005, 4(10):854-865.
100. Craciun FL, Schuller ER, Remick DG: Early enhanced local neutrophil recruitment in peritonitis-induced sepsis improves bacterial clearance and survival. *J Immunol* 2010, 185(11):6930-6938.

101. Henson PM, Johnston RB, Jr.: Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *The Journal of clinical investigation* 1987, 79(3):669-674.

102. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *The New England journal of medicine* 1989, 320(6):365-376.

103. CA. D: Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997, 112(6 Suppl):321S-329S.

104. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A: Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *The Journal of infectious diseases* 2000, 181(1):176-180.

105. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews* 2007, 87(1):315-424.

106. Deitch E: Gut lymph and lymphatics: a source of factors leading to organ injury and dysfunction. *Annals of NY Academy of Sciences* 2010, 1207 (Suppl 1):E103-111.

107. Shih CC CS, Chen A, Wu JY, Liaw WJ, Wu CC: Therapeutic effects of hypertonic saline on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Critical care medicine* 2008, 36(6):1864-1872.

108. Ayala A CI: Immune dysfunction in murine polymicrobial sepsis: mediators, macrophages, lymphocytes and apoptosis. *Shock* 1996, 6(Suppl 1):S27-38.

109. Song M KJ: Interleukin-6. *Critical care medicine* 2005, 33(12 Suppl):S463-465.

110. Turnbull IR JP, Buchman TG, Hotchkiss RS, Karl IE, Coopersmith CM.: Antibiotics improve survival in sepsis independent of injury severity but do not change mortality in mice with markedly elevated interleukin 6 levels. *Shock* 2004, 21(2):121-125.

111. JR. P: Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1998, 41(Suppl A):31-39.