UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito do MK-886 sobre a produção de leucotrienos e citocinas
em animais sépticos**

Juliana Borges Pereira

Ribeirão Preto

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito do MK-886 sobre a produção de leucotrienos e citocinas em
animais sépticos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia

Orientada: Juliana Borges Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Alves da
Rocha

*Versão corrigida da **Dissertação de Mestrado** o apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Aplicada à Farmácia. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pereira, Juliana Borges

Efeito do MK-886 sobre a produção de leucotrienos e citocinas em animais sépticos. Ribeirão Preto, 2011.

61p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Rocha, Maria José Alves da

1. Sepsis. 2. Leucotrienos. 3. Citocinas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Juliana Borges Pereira

Título: Efeito do MK-886 sobre a produção de leucotrienos e citocinas em animais sépticos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Alves da
Rocha

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha amada FAMÍLIA...

... por me proporcionar princípios sólidos e por ter oferecido uma educação que passarei adiante,

...aos meus pais José Donizeti e Nívia, por serem minha fonte de inspiração e alimentarem todos os meus sonhos sem medir esforços,

...aos meus irmãos Guilherme e Gabriel, por estarem sempre ao meu lado. A minha irmã Natalia (in memorian), por ser um anjo que me acompanha,

...ao João Henrique, que sempre me apoiou e dedicou atenção, carinho e amor.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha pelo conhecimento adquirido, oportunidades que contribuíram de forma direta para meu crescimento acadêmico e científico. A você, meus sinceros agradecimentos.

À minha amiga Nadir Fernandes pelo incentivo, carinho e orientação técnica durante os experimentos.

Aos professores que permitiram o uso de seus laboratórios e equipamentos necessários para execução desse trabalho.

Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, FMRP-USP

Prof. Dr. Luiz Guilherme Branco, FORP-USP

Prof. Dr. Luís Carlos Navegantes, FMRP-USP

Prof. Dr. Sérgio Akira, FCFRP-USP

Aos professores, os quais contribuíram para minha formação científica.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP-USP, Rosana, Ana Maria e Henrique pela atenção.

Aos funcionários dos Biotérios pelo importante trabalho que executaram para manter os animais em condições ideais para os experimentos.

Aos amigos do Laboratório, Aline, Elaine, Fábio, Josilene, Juliana R., Lucas, Luís Henrique, Mariana, Mario, Paulo e Tatiana, pela amizade, incentivos e pela convivência agradável.

Às minhas amigas, Thalita e Letycia pela convivência e discussões científicas.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado fazendo os meus dias mais felizes.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de diferentes formas para realização desse trabalho.

RESUMO

PEREIRA, J.B. **Efeito do MK-886 sobre a produção de leucotrienos e citocinas em animais sépticos**. 2011. 61f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2011.

Os leucotrienos (LTs) e as citocinas são mediadores inflamatórios produzidos durante a sepse e que podem apresentar uma tarefa moduladora na secreção de arginina-vasopressina (AVP). Na fase aguda da sepse as concentrações plasmáticas de AVP encontram-se aumentadas e na fase tardia em níveis basais, apesar da hipotensão progressiva. Nosso objetivo foi analisar o efeito da injeção intraperitoneal de MK-886, (inibidor da síntese de leucotrienos), sobre a produção de LTs e de citocinas no sítio infeccioso e plasma de animais sépticos. Foram usados ratos Wistar que receberam injeções intraperitoneais de MK-886 (4mg/kg) ou veículo (DMSO 5%) 1h antes da indução de sepse experimental por ligadura e perfuração cecal (CLP) ou da operação fictícia (OF). Os animais foram decapitados 0, 4 e 24h após CLP ou OF. O sangue foi coletado para a determinação do sódio sérico, hematócrito, citocinas, LTB₄. O lavado peritoneal foi coletado para dosagem de citocinas. O hipotálamo foi removido e incubado para a análise de cis-LTs. O sódio sérico diminuiu, o hematócrito aumentou e os cis-leucotrienos hipotalâmicos não apresentaram alterações significantes após 4 horas de CLP. A sepse provocou um aumento nas concentrações de TNF- α , no sítio infeccioso, mas não foi detectada no plasma. As citocinas IL-1 β e a IL-6 aumentaram em 4 horas tanto no sítio infeccioso como no plasma. A análise dos resultados de LTB₄ plasmático mostrou uma diminuição das concentrações 24 horas após o CLP. A administração do MK-886 não modificou o sódio, o hematócrito e aparentemente nem os cis-leucotrienos hipotalâmicos. No sítio infeccioso a droga causou um aumento nas concentrações de TNF- α 4 e 24 horas enquanto as de IL-1 β não se modificaram e as de IL-6 aumentaram apenas 4 horas após o CLP. Entretanto, no plasma, a droga diminuiu acentuadamente as concentrações tanto de IL-1 β como de IL-6. A análise do LTB₄ plasmático mostrou efeito da droga em 4 horas, mas não em 24 horas da sepse. Os resultados deste estudo sugerem que os LTS regulam de maneira diferente a produção de citocinas no plasma e no foco infeccioso e podem explicar os efeitos destes mediadores sobre a secreção de AVP durante a sepse.

Palavras-chaves: inflamação sistêmica, infecção, ELISA, sepse.

ABSTRACT

PEREIRA, J.B. **Effect of MK-886 in leukotrienes and cytokines production in septic animals.** 2011. 61f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2011.

Leukotrienes (LTs) and cytokines are inflammatory mediators produced during sepsis and may have a task in modulating the secretion of vasopressin (VP). In the acute phase of sepsis, the plasma AVP concentrations are increased and in the late stage at basal levels, despite the progressive hypotension. Our goal was to analyze the effect of intraperitoneal injection of MK-886 (leukotriene synthesis inhibitor) on the production of LTs and cytokines in the infectious site and plasma of septic animals. We used Wistar rats that received intraperitoneal injection of MK-886 (4.0mg/kg) or vehicle (DMSO 5%) 1 h before induction of experimental sepsis by cecal ligation and puncture (CLP) or sham operation (OF). The animals were decapitated at 0, 4 and 24 h after surgeries and blood was collected for determination of serum sodium, hematocrit, cytokines and LTB₄. The peritoneal fluid was collected for cytokine assay. The hypothalamus was removed and incubated for the analysis of cis-LTs. Serum sodium decreased, hematocrit increased and hypothalamic cis-leukotrienes did not show significant changes after 4 hours of CLP. Sepsis caused increase in the TNF- α concentrations in the site of infection, but was not detected in plasma. The cytokines IL-1 β and IL-6 increased by 4 hours both in the plasma as in the site of infection. The results of LTB₄ showed a decrease in plasma concentrations 24 hours after CLP. The administration of MK-886 did not alter sodium, hematocrit, and apparently neither the cis-hypothalamic leukotrienes. At the site of infection the drug caused an increase in the concentrations of TNF- α 4 and 24 hours while IL-1 β remained unchanged and IL-6 increased only 4 hours after CLP. However, in the plasma the drug markedly diminished the concentrations of IL-1 β and IL-6. The analysis of LTB₄ in plasma showed effects of the drug in 4 hours but not 24 hours of sepsis. The results of this study suggest that LTs differentially regulate the cytokine production in the plasma and in the site of infection, and may explain the effects of these mediators in AVP secretion during sepsis.

Keywords: Systemic inflammation, infection, ELISA, sepsis.

RESUMEN

PEREIRA, J.B. Efecto del MK-886 la central de producción de los leucotrienos y las citocinas en animales sépticos. 2011. 61f. Disertación (Masters). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2011.

Los leucotrienos (LTs) y las citoquinas son mediadores inflamatorios producidos durante la sepsis y puede haber una tarea en la secreción de la modulación de la arginina vasopresina (AVP). En la fase aguda de la sepsis AVP concentraciones plasmáticas se incrementan en la fase tardía se encuentran en niveles basales, pesar de la hipotensión progresiva. Nuestro objetivo fue analizar el efecto de la inyección intraperitoneal de MK-886, (inhibidor de la síntesis del leucotrieno) en la producción de LTs y citoquinas en el sitio de la infección y el plasma de animales sépticos. Hemos utilizado ratas Wistar que recibieron inyecciones intraperitoneales de MK-886 (4.0mg/kg) o vehículo (DMSO al 5%) 1 h antes de la inducción de la sepsis experimental por ligadura cecal y punción (CLP) o cirugía simulada (OF). Los animales fueron decapitados a 0, 4 o 24h após CLP. La sangre fue recolectada para la determinación de niveles séricos de sodio, hematocrito, citoquinas, LTB₄. El líquido peritoneal se recogieron para el ensayo de citoquinas. El hipotálamo se retiró y se incubó durante el análisis de los cis-LTs. La disminución del sodio sérico, aumento de hematocrito y cis-leucotrienos hipotalâmicos não mostrou cambios significativos después de 4 horas de CLP. Sepsis causó un aumento de las concentraciones de TNF- α en el sitio de la infección, pero no se detectó en el plasma. Las citocinas IL-1 β e IL-6 aumentó un 4 horas, tanto en plasma como el sitio de la infección. Los resultados de LTB₄ plasmático reveló una disminución en las concentraciones de 24 horas después de CLP. La administración de MK-886 no alteró de sodio, hematocrito, y al parecer ni el cis-leucotrienos hipotálamo. En el sitio de la infección de la droga causó un aumento en las concentraciones de TNF- α 4 y 24 horas mientras la IL-1 β no cambio e la IL-6 aumentó sólo 4 horas después de CLP y. Sin embargo, in el plasma el fármaco, marcadamente disminuyó las concentrations de IL-1 β e IL-6. El análisis de LTB₄ en el plasma mostró efectos de la droga en 4 horas, pero no las 24 horas de la sepsis. Los resultados de este estudio sugerem que los LTs regulan diferencialmente la producción de citoquinas en el plasma y en el sitio de la infección, y pueden explicar los efectos de estos mediators en la secretion de AVP durante la sepsis.

Las palabras claves: La inflamación sistémica, infección de ELISA, La sepsis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina.....	16
Figura 2. Cavidade peritoneal do rato.....	22
Figura 3. Sítio de ação da droga MK-886.....	22
Figura 4. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o sódio	29
Figura 5. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o hematócrito.	30
Figura 6. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o cis-leucotrienos no hipotálamo.....	31
Figura7. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o lactato desidrogenase.....	32
Figura 8. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o TNF- α no lavado peritoneal	33
Figura 9. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o IL-1 β no lavado peritoneal	34
Figura 10. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o IL-6 no lavado peritoneal.....	35
Figura 11. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o IL-1 β plasmática.....	36
Figura 12. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o IL-6 plasmática.....	37
Figura 13. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o LTB ₄ plasmático.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o Sódio.....	57
Tabela 2. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o Hematócrito.....	57
Tabela 3. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre as concentrações de cis-leucotrienos centrais.....	58
Tabela 4. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o lactato desidrogenase.....	58
Tabela 5. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de TNF- α no lavado peritoneal.....	59
Tabela 6. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de IL-1 β no lavado peritoneal.....	59
Tabela 7. Efeito da administração sistêmica de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de IL-6 no lavado peritoneal.....	60
Tabela 8. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de IL-1 β plasmático.....	60
Tabela 9. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de IL-6 plasmático.....	61
Tabela 10. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre a concentração de LTB ₄ plasmático.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HPETE - 5-hidroperoxieicosatetraenóico	GPR17 - Receptor órfão acoplado à proteína G
5-LO - 5-lipoxigenase	i.c.v. – Intracerebroventricular
15-HPETE- 15-hidroperoxieicosatetraenóico	i.v: Intravenosa
AA - Ácido araquidônico	h - Hora (s)
ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico	IL-1 β - Interleucina-1 β
ADH - Hormônio anti-diurético	IL-1ra: receptor antagonista de IL-1
ANOVA - Análise de variância simples	IL-6- Interleucina-6
AVP - Arginina vasopressina	ILAS - Instituto Latino-Americano de Sepsis
BLT ₁ - Receptor 1 do LTB ₄	i.p. - Intraperitoneal
BLT ₂ - Receptor 2 do LTB ₄	LBP - Proteína ligadora de LPS
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais	LH - Hormônio luteinizante
Cis-leucotrienos - Cisteinil leucotrienos	LPS - Lipopolissacarídeo
CisLT ₁ - Receptor 1 dos cis-leucotrienos	LTA - Ácido lipoteicoico
CisLT ₂ - Receptor 2 dos cis-leucotrienos	LTA ₄ - Leucotrieno A ₄
CLP - <i>Cecal ligation and puncture</i> ou ligadura e perfuração cecal	LTA ₄ -H - LTA ₄ hidrolase
cPLA ₂ - Fosfolipase A ₂ citosólica	LTB ₄ - Leucotrieno B ₄
DMSO - Dimetilsulfóxido	LTC ₄ - Leucotrieno C ₄
EPM - Erro padrão da média	LTC ₄ -S - LTC ₄ sintase
e.v. - Endovenosa	LTD ₄ - Leucotrieno D ₄
FLAP - Proteína Ativadora da 5-lipoxigenase	LTE ₄ - Leucotrieno E ₄
G - Gauge	LTs - Leucotrienos
	M - Média

mmHg - Milímetros de mercúrio	TBE - Tribromoetanol
MK-571 - Antagonista do receptor 1 dos cis-leucotrienos	TLR - Receptor toll-like
MK-886 - Inibidor da síntese de leucotrienos	TLR-2 - Receptor toll-like 2
mM - Milimolar	TLR-4 - Receptor toll-like 4
MODS - Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas	TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa
n - Número de animais	TMB: 3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina
NF- κ B - Factor nuclear Kappa B	V1a - Receptor V1
NO - Óxido nítrico	V1b - Receptor V3
°C - Graus Celsius	V ₂ - Receptor V ₂
OF - Operação fictícia	
PAF - Fator ativador de plaquetas	
PAMPs: Padrões moleculares associados à patógenos	
PBS - Fosfato monobásico	
PIRO- Predisposition, Insult infection, Response, 'Organ dysfunction	
PVN - Núcleo paraventricular	
RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase	
RNA _m - RNA mensageiro	
SBF: Soro fetal bovino	
SIRS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica	
SNC - Sistema Nervoso Central	
SON - Núcleo supraóptico	

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Seps, Seps grave e Choque Séptico.....	2
1.2 Modelos de seps experimental.....	4
1.3 Fisiopatologia da Seps	5
1.4 Citocinas e Seps	7
1.5 Vasopressina e seps	9
1.6 Leucotrienos.....	11
1.7 Leucotrienos e Sistema Nervoso.....	13
1.8 Leucotrienos e Seps.....	14
2. OBJETIVO	17
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Animais.....	20
3.2 Protocolo experimental.....	20
3.3 Anestesia.....	21
3.4 Ligadura e Perfuração Cecal (CLP)	21
3.5 Droga utilizada	22
3.6 Determinação do Hematócrito.....	23
3.7 Separação do plasma e do soro.....	23
3.8 Determinação do Sódio	23
3.9 Determinação de Citocinas do Plasma	24

3.10 Determinação do LTB ₄ plasmático	24
3.11 Preparo das amostras hipotalâmicas para as dosagens de cis-leucotrienos	25
3.12 Viabilidade dos fragmentos Hipotalâmicos.....	25
3.13 Determinação dos cis-leucotrienos no hipotálamo	26
3.14 Determinação de Citocina do Lavado Peritoneal.	26
3.15 Análise estatística	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Efeito do MK-886 4mg/Kg sobre sódio sérico e hematócrito.....	29
4.2 Efeito do MK-886 4mg/Kg sobre os cis-leucotrienos hipotalâmicos	30
4.3 Efeito do MK-886 4mg/Kg sobre o lactato desidrogenase.....	31
4.4 Efeito do MK-886 4mg/Kg sobre a produção de citocinas no lavado peritoneal.....	32
4.5 Efeito do MK-886 4mg/Kg sobre a produção de citocinas plasmáticas	35
4.6 Efeito do MK-886 4mg/Kg sobre LTB ₄ plasmático.....	37
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sepses, Sepses grave e Choque Séptico

A sepsis é definida como uma síndrome clínica, decorrente de uma infecção grave, associada à inflamação sistêmica e lesão tecidual, que resulta de uma complexa interação entre o hospedeiro e o agente infeccioso (BONE *et al.*, 1992; LEVY *et al.*, 2003).

A sepsis grave está associada à hipotensão com a pressão arterial sistêmica menor que 90mmHg, anormalidades de perfusão, disfunção orgânica, hipoxemia pulmonar, dano renal com a presença de oligúria e/ou creatinina elevada, problemas hepáticos, alterações hematológicas, e acometimento do sistema nervoso central e como consequência alteração do estado mental (BONE *et al.*, 1992; LEVY *et al.*, 2003; SILVA, 2006).

A sequência desse processo fisiopatológico é o choque séptico, no qual a hipotensão é refratária à sobrecarga hídrica intravenosa e vasopressores convencionais (BONE *et al.*, 1992; BONE *et al.*, 1997). A síndrome da disfunção múltipla dos órgãos (MODS) ocorre quando a hipotensão e a hipoperfusão não é restabelecida provocando alteração da função orgânica levando a falência total dos órgãos (BONE *et al.*, 1992; BONE *et al.*, 1997; LEVY *et al.*, 2003).

As definições de sepsis, sepsis grave e choque séptico foram propostas e discutidas em duas conferências muito importantes. A conferência foi realizada em 1991 pela *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine* e teve como objetivo a definição prática de sepsis, a ser utilizada para melhorar o diagnóstico e intervir em um tratamento precoce (BONE *et al.*, 1992). A segunda conferência aconteceu no ano de 2001 e o objetivo foi revisar as definições de sepsis, e acrescentar uma série de sinais e

alterações laboratoriais que são encontradas em pacientes nessas condições. Além disso, foi proposto o sistema **Predisposition, Insult infection, Response, Organ dysfunction** (PIRO), o qual classifica e caracteriza os pacientes de acordo com suas condições de predisposição como: natureza e extensão da infecção, fatores genéticos, grau da resposta inflamatória e da disfunção de órgãos. Já o termo Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), que também foi discutido, é definido como uma reação inflamatória sistêmica desencadeada pelo organismo frente a um desafio infeccioso que pode ser causado por bactéria, fungos ou vírus ou estímulos não infecciosos como pancreatite, isquemia, trauma ou queimadura grave (LEVY *et al.*, 2003).

Vários estudos epidemiológicos realizados em diferentes países apontam a sepse e suas conseqüências (sepse grave e choque séptico) como as principais causas de morte em unidades de terapia intensiva (DELLINGER *et al.*, 2008 ANGUS e WAX, 2001). Nos Estados Unidos mais de 200 mil pacientes com sepse morrem por ano e os gastos totais são de 17 bilhões de dólares. Existe a probabilidade que essa incidência aumente 1,5% por ano devido ao envelhecimento da população e em 2020 ocorrerá mais de 1.110.000 casos de sepse (ANGUS *et al.*, 2001, MARTIN *et al.*, 2003). De acordo com uma pesquisa realizada junto ao Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), no Brasil cerca de 20% dos leitos são ocupados por pacientes com sepse grave e a taxa de mortalidade é de aproximadamente 43,8%, sendo que os custos por pacientes giram em torno de 20 mil reais (SILVA, 2006; SOGAYAR *et al.*, 2008).

As altas taxas de mortalidade provavelmente são devidas ao aumento de procedimentos invasivos, microorganismos multirresistentes e também pelo

envelhecimento da população (BONE, 1991, BONE *et al.*, 1992). Em 2002, diante desses elevados índices de mortalidade, foi iniciada a Campanha Sobrevivendo à Sepse (*Surviving Sepsis Campaign*) para reduzir a mortalidade em 25%, e preconizar pacotes com condutas para tratar pacientes sépticos (DELLINGER *et al.*, 2008). No Brasil, 43 hospitais já aderiram à campanha, a fim de diminuir os índices de óbitos por sepse, porém essa aderência, esta muito aquém do esperado. Na região norte do país, por exemplo, nenhum hospital participa da campanha (TELES *et al.*, 2008).

Para pesquisar o processo fisiopatológico que ocorre na sepse, vários modelos experimentais têm sido usados. (DEJAGER *et al.*, 2011).

1.2. Modelos de sepse experimental

Dentre os modelos experimentais temos: a infecção tecidual leve, infusão intravascular de endotoxinas ou bactéria viva, peritonite bacteriana, modelos de pneumonia, meningite e perfuração cecal ou do inglês *Cecal ligation and puncture* (CLP) (DEJAGER *et al.*, 2011; VILLA *et al.*, 1995).

Todos os modelos citados anteriormente possuem pontos positivos e pontos negativos sendo que, os mais usados são o de injeção intraperitoneal (i.p.) ou endovenosa (e.v.) de LPS (lipopolissacarídeo) e o CLP (DEJAGER *et al.*, 2011; WALLEY *et al.*, 1996; BENJAMIM *et al.*, 2000; MATSUNAGA *et al.*, 2000; XIA e KRUKOFF, 2001).

O LPS se difere nas alterações imunológicas pois induz mais rapidamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias comparado ao CLP. Além disso, em estudos experimentais o LPS aumentou significativamente as citocinas interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator necrose tumoral

(TNF- α) no plasma. Em contraste, o CLP mostrou uma clara tendência em aumentar IL-1 e IL-6, mas não o TNF- α (SCHEIERMANN *et al.*, 2011).

Adicionalmente, o modelo de injeção de LPS apresenta várias limitações, sendo uma delas a ausência de foco infeccioso e, portanto de similaridade com o que acontece com o paciente na clínica. Por isso ele é considerado mais um modelo para endotoxemia do que propriamente para sepse (DEJAGER *et al.*, 2011). O modelo CLP considerado o “padrão ouro”, apresenta um foco infeccioso e reproduz as características fisiopatológicas da sepse clínica. Esse modelo apresenta uma diversidade de microrganismos gram-positivos e negativos com a liberação contínua de agentes infecciosos da flora microbiana (DEJAGER *et al.*, 2011; REMICK *et al.*, 2000; ECHTENACHER *et al.*, 2001; FREISE *et al.*, 2001).

1.3. Fisiopatologia da Sepse

Durante a sepse, bactérias gram-positivas e/ou gram-negativas podem iniciar uma cascata patogênica complexa. O processo inicia-se com a proliferação de microorganismos no sítio infeccioso, podendo atingir o sistema sanguíneo ou proliferar localmente e produzir várias substâncias, as quais estimulam a liberação de mediadores endógenos a partir de macrófagos, neutrófilos e outras células do sistema imune. O excesso de mediadores leva a um quadro de desequilíbrio do organismo que não é capaz de controlar a situação e retornar às condições fisiológicas normais (BONE, 1991; BONE *et al.*, 1997; SANDS *et al.*, 1997; DELLINGER *et al.*, 2008). Em 85% dos casos de choque séptico a infecção se dá por bactérias gram-negativas e positivas (SANDS *et al.*, 1997).

A resposta inflamatória é desencadeada devido aos componentes estruturais dos microrganismos que podem ser o lipopolissacarídeo das bactérias gram-negativas e o ácido lipoteicóico das gram-positivas. Esses componentes estruturais são chamados padrões moleculares associados à patógenos (Pamps) (MEDZHITOV e JANEWAY, 1997; ADEREM e ULEVITCH, 2000; SRISKANDAN e ALTMANN, 2008).

As células do sistema imune possuem receptores capazes de reconhecer os Pamps. São eles: receptores CD14 e os receptores toll-like (TLRs) (ADEREM e ULEVITCH, 2000; READ e WYLLIE, 2001; COHEN, 2002).

O processo para ativação do sistema imune ocorre quando o LPS presente em bactérias gram-negativas inicialmente interage com a proteína ligadora de LPS (LPB), opsonizando o LPS que é reconhecido pelo receptor CD14 presentes nas células imunes formando o complexo LPS-LPB-CD14 que se liga ao receptor toll-like 4 (TLR4). O ácido lipotecóico presente nas bactérias gram-positivas por sua vez é reconhecido pelos receptores toll-like 2 (TLR-2) (ADEREM e ULEVITCH, 2000; COHEN, 2002).

A ativação dos receptores TLR-2 ou TLR-4 resulta na ativação da cascata de sinalização, ativando o fator de transcrição NF- κ B, ocorrendo a transcrição de genes imunomodulatórios e conseqüentemente a liberação excessiva de mediadores inflamatórios como o TNF- α , IL-1, IL-6, fator ativador de plaquetas (PAF), e leucotrienos (LTs). Esses mediadores são quimioatraentes, recrutam e ativam células para foco infeccioso na tentativa de combater a infecção produzindo mais mediadores, formando um ciclo vicioso durante a sepse, descontrolando todo organismo (COHEN, 2002; RIOS-SANTOS *et al.*, 2003; SRISKANDAN e ALTMANN, 2008).

O sistema complemento também pode se ativado na fase inicial da sepse, a fim de controlar a infecção. Estudo com pacientes sépticos verificaram um aumento de C3a e uma diminuição de C3 no início da sepse. Os altos níveis de C3a plasmático foram correlacionados com mortalidade, podendo ser usados como biomarcadores da sepse (STOVE *et al.*, 1996).

1.4 Citocinas e Sepse

Os mediadores inflamatórios são produzidos na periferia principalmente por células como neutrófilos, monócitos e linfócitos, mas podem ser produzidas por outros tipos celulares. No cérebro, essas citocinas são produzidas por astrócitos e células da microglia. Portanto essas citocinas podem ser sintetizadas tanto na periferia como no cérebro (GHORBEL *et al.*, 2003; GONZALEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2006). A primeira citocina a aparecer em processos infecciosos é o TNF- α , seguida pela IL-1 que estimulam a produção de IL-6. Em modelo de CLP em camundongos, observou-se o aumento de TNF- α , IL-1 e IL-6 no sítio da infecção, e as concentrações de IL-1 e IL-6 eram menores quando dosadas no plasma (WALLEY *et al.*, 1996; EBONG *et al.*, 1999).

As concentrações de IL-1, IL-6 e TNF- α estão aumentadas em pacientes com choque séptico mais do que aqueles com sepse grave. A concentração de cada citocina foi vista estar associada com a severidade e evolução da disfunção de órgãos (BOZZA *et al.*, 2007).

Outro estudo clínico compreendendo 43 pacientes com sepse avaliou as concentrações das citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 e correlacionaram as de IL-6 com a gravidade da doença e disfunção de órgãos (FRINK *et al.*, 2009).

Dados na literatura mostram que a IL-1 pode interagir *in vitro* e *in vivo*

com prostaglandinas (PGs), leucotrienos e outras citocinas (DINARELLO *Ca, et al.*, 1989). Através dos resultados da administração intravenosa de antagonista de receptor IL-1 (IL1ra) concluiu-se que esta citocina pode ser um mediador necessário para o aumento da produção de PGs, cis-leucotrienos, IL-6 e TNF- α em pacientes sépticos (SLOTMAN *et al.*, 1995; SLOTMAN *et al.*, 1997).

Os leucotrienos por sua vez parece serem capazes de estimular a produção de citocinas. Em monócitos humanos foi demonstrado que o LTB₄ é capaz de estimular a produção de IL-6, pelo aumento do gene de transcrição do NF-K β (BRACH *et al.*, 1992; ROLA-PLESZCZYNSKI e STANKOVA, 1992). Já a inibição de todos os leucotrienos por MK-886 pode resultar na diminuição da produção de IL-6 e TNF- α (BRACH *et al.*, 1992; AL-AMRAN *et al.*, 2011). Todos esses mediadores inflamatórios também podem chegar ao sistema nervoso central (SNC) e promover a ativação de neurônios que modulam diferentes funções orgânicas, autonômicas, neuroendócrinas e até mesmo funções comportamentais (MCCANN *et al.*, 2000; ENGBLOM *et al.*, 2002).

As citocinas no cérebro regulam muitos processos durante a fase aguda da infecção, tais como febre, hipofagia, sono, mudanças neuroendócrinas (HOPKINS e ROTHWELL, 1995). TNF- α , IL-1, IL-6, são capazes de ativar o eixo hipotálamo-hipófise e estimular a secreção de vasopressina (DE LAURENTIIS *et al.*; MASTORAKOS *et al.*, 1994; MCCANN *et al.*, 2000; BERCZI *et al.*, 2009).

Estudos demonstram que a IL-6 pode estar coexpressa com a arginina-vasopressina (AVP) em células magnocelulares do SON e PVN de ratos. Adicionalmente, tem sido reportado que a injeção intravenosa da IL-6 estimula a liberação plasmática de AVP em humanos (MASTORAKOS *et al.*, 1994;

GHORBEL *et al.*, 2003; GONZALEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2006).

1.5 Vasopressina e Sepses

A vasopressina também conhecida como hormônio antidiurético (ADH) é um nonapeptídeo com duas cisteínas ligadas a uma ponte dissulfeto nas posições 1 e 6. Esse neuro-hormônio é sintetizado em neurônios magnocelulares localizados nos núcleos (SON) e (PVN) do hipotálamo como um grande pré-pró-hormônio composto pela vasopressina (o hormônio ativo), pela neurofisina (uma proteína carreadora axonal) e pela coceptina (um glicopeptídeo N-terminal). Os grânulos neurosecretórios contendo o hormônio ativo migram via eixo hipotálamo-hipófise para serem estocados em terminais axonais na neurohipófise onde após estímulos adequados secretam AVP na circulação (SWAAB *et al.*, 1975; BARBERIS *et al.*, 1998).

A AVP possui pelo menos três subtipos de receptores que estão acoplados à proteína G, o receptor (V_1 ou V_{1a}) encontra-se no coração, fígado, testículos, cérebro, rins e especialmente no músculo liso vascular. A alta densidade de receptores V_1 em células musculares lisas torna um potente vasoconstrictor (THIBONNIER *et al.*, 1997, HOLMES *et al.*, 2001; HOLMES *et al.*, 2003). O receptor (V_2) está presente nos ductos coletores renais, sendo caracterizado pela sua ação antidiurética. Já o receptor (V_3 ou V_{1b}) é encontrado na adenohipófise está relacionada à estimulação da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (INNAMORATI *et al.*, 1996; ERLENBACH e WESS, 1998).

Os principais estímulos para secreção de AVP são o aumento da osmolalidade plasmática, hipovolemia, hipotensão severa, acidose, náusea e

pela ação de mediadores, como, NO, histamina, acetilcolina, dopamina e outras catecolaminas, PGs, além das citocinas como a IL-1 e IL-6 (DE LAURENTIIS *et al.*, 2010; WOOD e CHEN, 1989; MCCANN *et al.*, 2000; GHORBEL *et al.*, 2003; HOLMES *et al.*, 2003; GONZALEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2006; BERCZI *et al.*, 2009). Dentre as alterações neuroendócrinas, é visto que durante a sepse o eixo hipotálamo-hipófise encontra-se alterado, podendo inibir ou estimular a liberação de vários hormônios dentre os quais a vasopressina (CORREA *et al.*, 2007; PANCOTO *et al.*, 2008; ATHAYDE *et al.*, 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009).

Durante a sepse observa-se que na fase inicial os pacientes apresentam altas concentrações de vasopressina plasmática, provavelmente, como tentativa de restabelecer a pressão sanguínea que nesta fase começa a diminuir. Já na fase tardia da sepse os pacientes apresentam níveis basais de vasopressina plasmática, mesmo em face da hipotensão progressiva denotando assim uma falência do sistema hipotálamo-neurohipofisário. Essa diminuição de AVP contribui para a progressão da hipotensão podendo levar ao choque séptico (LANDRY e OLIVER, 2001; SHARSHAR *et al.*, 2003).

Estes resultados clínicos foram comprovados experimentalmente em nosso laboratório usando-se o modelo de injeção de LPS ou ligação cecal e punção para a indução de endotoxemia ou sepse em ratos (BORGES e DA ROCHA, 2006; DE CARVALHO BORGES *et al.*, 2006; OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009). Recentemente no nosso laboratório foi visto que leucotrienos parece serem capazes de mediar a secreção de AVP durante a sepse (MARTINS *et al.*, 2011; ATHAYDE *et al.*, 2009).

Recentemente no nosso laboratório foi visto que leucotrienos parece serem capazes de mediar a secreção de AVP durante a sepse (MARTINS *et al.*, 2011; ATHAYDE *et al.*, 2009).

1.6 Leucotrienos

Os leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos derivados dos metabólitos do ácido araquidônico (AA) pela via da 5-lipoxinagenase (5-LO). São produzidos principalmente por leucócitos, mas também podem ser sintetizados pelo músculo vascular liso, células endoteliais, eritrócitos, plaquetas e por neurônios (FEINMARK e CANNON, 1986; MARSHALL *et al.*, 1995).

Sua ativação é iniciada na presença de patógenos ou mediadores solúveis que são potentes quimioatraentes para neutrófilos e eosinófilos. A ativação celular por patógenos ou mediadores solúveis como IL-1, TNF- α e IL-6, e outros, produz um distúrbio na membrana celular e leva ao aumento de cálcio intracelular que resulta na translocação de fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) para as membranas nucleares e plasmáticas. Este processo faz com que ocorra a liberação do ácido araquidônico (AA) dos fosfolipídeos de membrana. O AA liberado pode ser metabolizado por diversas vias que vão originar às prostaglandinas, tromboxanos, 15-hidroperoxieicosatetraenóico (15-HPETE) e os leucotrienos (CLARK *et al.*, 1995; HENDERSON *et al.*, 1998; HIRABAYASHI e SHIMIZU, 2000).

A síntese de LTs ocorre quando, o AA liberado é transformado no núcleo da célula em ácido 5- hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE) que é rapidamente convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄) pela ação da 5-LO. Essa enzima é deslocada do citosol para membrana nuclear e ativada pela Proteína

Ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP). Ao final da via da 5-LO, o LTA₄ é enzimaticamente hidrolizado e transformado em leucotrieno B₄ (LTB₄), pela ação da enzima LTA₄ hidrolase. Ou, ainda, em LTC₄ pela ação da LTC₄ sintase, uma proteína de membrana integral que catalisa a conjugação de LTA₄ com glutathiona reduzida. Após a síntese do LTC₄, o mesmo pode ser metabolizado a LTD₄ e LTE₄, pela ação da gama-glutamil transferase e peptidases (MILLER *et al.*, 1990; PENROSE *et al.*, 1992; ABRAMOVITS *et al.*, 1993; MANCINI *et al.*, 1993; LAM *et al.*, 1994; FLAMAND *et al.*, 2007).

Os LTC₄, LTD₄ e LTE₄, são chamados de cisteinil leucotrienos ou cis-leucotrienos (MORLION *et al.*, 2000; HUI, FUNK, 2002; BENJAMIM *et al.*, 2005).

O LTB₄ é um mediador quimioatraente responsável pelo recrutamento de leucócitos da circulação sanguínea e para o tecido infectado, aumenta a permeabilidade capilar, promove ativação e adesão de leucócitos ao endotélio vascular (HENDERSON *et al.*, 1998; GOULET *et al.*, 2000; FLAMAND *et al.*, 2007).

Os cis-LTs exercem papel na formação do edema durante a resposta inflamatória, promove broncoconstrição e produção de muco (DAHLEN *et al.*, 1980). Além disso, os cis-LTs exercem papel importante nos vasos, sendo responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular (DAHLEN *et al.*, 1981; HENDERSON *et al.*, 1998; GOULET *et al.*, 2000; FLAMAND *et al.*, 2007).

Para que LTB₄ e Cis-LTs promovam suas ações biológicas eles devem se ligar aos receptores de membrana acoplados à proteína G. Há cinco receptores, dois deles são para LTB₄ (nomeados BLT₁ e BLT₂), e três para cis-

LTs (conhecidos como CisLT_1 , CisLT_2 e GPR17) (LYNCH *et al.*, 1999; HEISE *et al.*, 2000; KAMOHARA *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2001; CIANA *et al.*, 2006).

O receptor BLT_1 é encontrado em leucócitos e parece ser responsável pela atividade quimiotática e quimiocinética destas células (YOKOMIZO *et al.*, 2000; YOKOMIZO *et al.*, 2001). Enquanto o receptor BLT_2 promove aumento do metabolismo oxidativo, quimiotaxia e está presente em diferentes tecidos e células. (TODA *et al.*, 1999; YOKOMIZO *et al.*, 2000). Contudo, no sistema nervoso central a existência de receptores para LTB_4 ainda não foi descrita (TODA *et al.*, 1999; YOKOMIZO *et al.*, 2000).

O receptor CisLT_1 está localizado principalmente em leucócitos do sangue periférico, pulmão e baço e em células musculares lisas das vias aéreas, e tem como função promover broncoconstrição e regulação da adesão celular (LYNCH *et al.*, 1999; SARAU *et al.*, 1999; HUI e FUNK, 2002).

O CisLT_2 foi encontrado no pulmão, leucócitos do sangue periférico, baço, coração, glândula adrenal, e em várias regiões do cérebro (HEISE *et al.*, 2000; HUI e FUNK, 2002). O receptor GPR17 é homólogo aos receptores para cis-LTs e está ligado a quadros de isquemia (CIANA *et al.*, 2006; LECCA *et al.*, 2008).

1.7 Leucotrienos no Sistema Nervoso Central

Estudos realizados em várias regiões do cérebro verificaram a presença dos metabólitos do ácido araquidônico, e esses, parecem ter funções no controle da secreção de diferentes hormônios do hipotálamo e da glândula adenohipófise (HULTING *et al.*, 1985).

A produção de LTB_4 esta distribuída uniformemente por todo o cérebro

do rato, enquanto que altos níveis de LTC₄ foram encontrados no hipotálamo (HULTING *et al.*, 1985; LINDGREN *et al.*, 1984; MIYAMOTO *et al.*, 1987).

Técnicas de imunohistoquímica mostraram a presença de imunoreatividade para LTC₄ sintase no hipotálamo e eminência mediana, sugerindo que os leucotrienos estejam associados às funções neuroendócrinas (SHIMADA *et al.*, 2005).

Dentre as funções neuroendócrinas, já encontra-se relatado que o LTC₄ estimula a liberação do hormônio luteinizante (LH) em cultura de células da adenohipófise (HULTING *et al.*, 1985).

A expressão de RNAm para as enzimas 5-LO e FLAP foram encontradas em várias regiões do encéfalo de ratos, incluindo hipocampo e hipotálamo através das técnicas RT-PCR e Northern blot (LAMMERS *et al.*, 1996).

Em outro trabalho foi possível observar RNAm do receptor CisLT₂ na hipófise e no hipotálamo de humanos, sugerindo que os cis-LTs plasmáticos possam exercer ações centrais (HEISE *et al.*, 2000).

O LTC₄ no SNC também parece estar relacionado com o eixo hipotálamo-neurohipofisário e a AVP. Em camundongos a LTC₄ sintase (LTC₄S) que dá origem aos cis-leucotrienos, foi identificada em neurônios magnocelulares vasopressinérgicos dos núcleos PVN, SON e supraquiasmático (SC) do hipotálamo e na área retroquiasmática (RC), além de nas terminações axonais na hipófise. A LTC₄ sintase é seletiva para neurônios vasopressinérgicos, sugerindo que o LTC₄, possa estar envolvido na regulação da secreção de vasopressina (SHIMADA *et al.*, 2005).

1.8 Leucotrienos e Sepses

Muitos estudos têm demonstrado a tarefa dos leucotrienos na sepsis e em outras doenças como a asma. Experimentos com humanos e animais evidenciam a importância desses mediadores em processos infecciosos (CAN *et al.*, 1998; ANDERSON e BLUMER, 2000; MORLION *et al.*, 2000; RIOS-SANTOS *et al.*, 2003; BENJAMIM *et al.*, 2005; ATHAYDE *et al.*, 2009).

Em modelo de endotoxemia por LPS, pesquisadores mostraram que as concentrações dos LTs estavam aumentadas e que o bloqueio da síntese dos LTs resultava em diminuição do TNF- α e da síntese dos eicosanóides (QUINN e SLOTMAN, 1999).

A participação dos cis-LTs nas manifestações cardiovasculares durante choque séptico tem sido relatada em estudos experimentais. Em coelhos, sepsis induzida por injeção de LPS causou uma diminuição severa na pressão arterial, e o pré- tratamento oral com inibidor da síntese de leucotrienos, MK-886 (5mg/Kg), atenuou o efeito hipotensivo ao lipopolissacarídeo (CAN *et al.*, 1998).

Em modelo de sepsis polimicrobiana foi visto que camundongos submetidos ao CLP e tratados com administração oral de MK-571 (antagonista do receptor cis-LT₁) apresentavam menor hipotensão induzida por sepsis. Além disso, quando tratados oralmente com MK-886 (1mg/Kg) apresentaram 100% de sobrevivência (BENJAMIM *et al.*, 2005).

Em experimentos realizados em nosso laboratório com o modelo de CLP também foi possível verificar um aumento da sobrevivência em ratos tratados com injeções intracerebroventriculares de MK-886 (inibidor da síntese de leucotrienos). Também foi visto que administração central com 1 μ /Kg desse

inibidor impediu o aumento dos níveis plasmáticos de AVP que ocorre normalmente em consequência da indução da sepse experimental (ATHAYDE *et al.*, 2009).

Em outro trabalho do grupo, injeção intraperitoneal com doses crescentes de MK-886 em animais sépticos por CLP provocou uma resposta dose-efeito nas concentrações plasmáticas de AVP, comprovando assim o papel mediador dos LTs na secreção do hormônio (Figura 1) (MARTINS *et al.*, 2011).

Fig. 4. Effect of intraperitoneal administration of MK-886 on plasma vasopressin levels. The results are expressed as means $\pm$ SEM; §P<0.05 compared to 4 h within the group; *P<0.05 compared to CLP + DMSO group; #P<0.05 compared to CLP + 1 mg/kg group; †P<0.05 compared to CLP + 2 mg/kg group. n = 6–12 each group.

Figura 1. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina. Retirado de Martins e colaboradores (2011).

Nesse trabalho, entretanto não foi possível comprovar se o MK-886 administrado via intraperitoneal foi capaz de afetar a produção desses mediadores no hipotálamo ou no plasma. Também não foi verificado se o MK-886 afeta a produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, as quais podem interferir na secreção de AVP e contribuir para o choque séptico.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Analisar o efeito do MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, na produção de leucotrienos e citocinas durante sepse experimental.

2.2. Objetivos específicos

Analisar os efeitos da administração intraperitoneal de MK-886

sobre:

- 2.2.1. O sódio sérico e o hematócrito em animais sépticos;
- 2.2.2. A produção de cis-LTs do hipotálamo *ex vivo* durante a sepse;
- 2.2.3. A produção de citocinas no sítio infeccioso em animais sépticos;
- 2.2.4. A concentração de citocinas plasmáticas em animais sépticos;
- 2.2.5. A concentração de LTB₄ no plasma durante a sepse.

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados em ratos adultos da linhagem Wistar, de peso corporal entre 250 ± 30 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo Campus de Ribeirão Preto. Eles foram mantidos em caixas individuais, com água e ração (6003/100110036, NUVILAB CR-1) a uma temperatura aproximadamente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12 horas.

Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto-USP (Protocolo nº 10.1.370.53.5). Animais submetidos à sepse polimicrobiana por CLP, se em grande sofrimento, foram eutanasiados seguindo critérios descritos em “Humane endpoints in shock research” (NEMZEK et al., 2004).

3.2. Protocolo experimental

Foram utilizados animais pré-tratados com 1 ml de MK-886 na concentração de 4mg/kg ou de seu solvente DMSO (dimetilsulfóxido) (Amresco, Solon, Ohio, USA) a 5%, administrados por via intraperitoneal (i.p), 1 hora antes da sepse induzida por CLP ou operação fictícia (OF). Os animais foram decapitados 0, 4 e 24 horas após a cirurgia CLP ou OF. Posteriormente, o sangue foi coletado para as determinações de sódio sérico, hematócrito, citocinas (IL-1 β , IL-6) e leucotrieno LTB₄ plasmático. O lavado peritoneal foi coletado com 7ml de fosfato monobásico (PBS) para dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6). O hipotálamo foi removido e

incubado no meio Krebs- Henseleit para dosagem de cis-leucotrienos e lactato desidrogenase.

3.3. Anestesia

Animais submetidos à manipulação cirúrgica foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de Tribromoetanol (TBE, Aldrich Chem. Corp. Inc.) 2,5% em solução salina, na dose de 1mL/100g de peso corporal.

3.4. Cirurgia de Ligadura e Perfuração Cecal (CLP)

Após serem anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de Tribromoetanol (TBE, Aldrich Chem. Corp. Inc.) 2,5% em solução salina, na dose de 1mL/100g de peso corporal os animais foram submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) com incisão central de 2cm no abdômen seguido de exposição do ceco e obstrução parcial do lúmen intestinal a nível distal da válvula íleo-cecal. Posteriormente 10 perfurações com agulha 16 G (Figura 2) foram realizadas na porção distal do ceco. A seguir, após verificação da saída de fezes o mesmo foi reintroduzido na cavidade abdominal. O fechamento da cavidade abdominal foi realizado em dois planos de sutura com pontos separados. Solução salina (7ml/animal) foi aplicada via subcutânea como líquido de reanimação (Hubbard et al., 2005). O grupo controle foi submetido à operação fictícia (OF), sem ligadura ou perfuração cecal, incluindo somente, laparotomia central, manipulação do ceco e fechamento da cavidade abdominal.

Figura 2. Cavidade peritoneal do rato. Seta indica o ponto da ligadura cecal onde foram feitas 10 perfurações com agulha 16G. Adaptado de Hebel e Stromberg (1986).

3.5. Droga utilizada

A droga utilizada no experimento foi o composto MK-886 (3 [1-(4-clorobenil)-3-t-butil-tio-5-isopropilindol-2-y1]-2,2-ácidodimetilpropanóico), um inibidor da síntese de LTs (LTA_4 , LTB_4 e cis-LTs). Essa droga apresenta esse efeito por inibir duas ações da proteína FLAP, a de se ligar ao ácido araquidônico (AA) e transferir esse substrato a 5-LO e a de estimular a utilização do AA pela enzima (ABRAMOVITZ et al., 1993; MANCINI et al., 1993). Além disso, a similaridade da FLAP com a LTC_4 sintase permite que o MK-886 também iniba esta última (LAM et al., 1994). A figura 3 mostra os sítios de ação da droga.

Figura 3. Sítio de ação do composto MK-886.

3.6. Determinação do hematócrito

Após a decapitação dos animais parte do sangue foi coletada do tronco e diretamente colocado em microcapilares heparinizados (Perfecta, SP, Brasil) para a determinação do hematócrito. Em seguida, os microcapilares foram selados na extremidade contrária à entrada de sangue com auxílio de uma lamparina e centrifugados por 3 minutos em centrífuga apropriada (Centrimicro Mod. 211, FANEN). A leitura do hematócrito foi feita com auxílio de um cartão próprio para essa finalidade que acompanha a centrífuga. A determinação deste parâmetro foi utilizada nesse estudo como índice indireto da volemia.

3.7. Separação do plasma e do soro

Uma parte do sangue foi coletada do tronco, em tubos plásticos, mantidos sob gelo, contendo heparina (0,1ml) e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos à 4°C para a separação do plasma. O mesmo foi dividido em dois microtubos plásticos para dosagem de citocinas (IL-1 β , IL-6) e leucotrieno LTB₄. Outra parte do sangue foi coletada em microtubos de plástico sem anticoagulante e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos à 4°C para a determinação do sódio sérico. O plasma e o soro foram armazenados a -80°C até a dosagem.

3.8. Determinação de sódio sérico

O sódio sérico foi determinado em fotômetro de chama Micronal, devidamente calibrado com solução padrão Micronal contendo 140mEq/L de sódio e 5mEq/L de potássio, diluída em água destilada na proporção de 1:100. Cada amostra foi diluída igualmente à solução padrão (30 μ L do plasma em

2,90mL de água destilada), homogeneizada e aspirada no fotômetro de chama para a leitura da concentração do sódio sérico.

3.9. Determinação de Citocinas plasmáticas (IL-1 β , IL-6)

As concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6, no plasma foram determinadas por ensaio ELISA sanduíche. Primeiramente, as placas de ELISA foram revestidas com 100 μ L dos anticorpos monoclonais anti-IL-1 β e anti-IL-6, em tampão de carbonato de sódio de 0.1M (pH 8,2) e incubadas por 18 horas na temperatura de 4°C. Os poços foram lavados com 0,1% tampão fosfato salina (PBS 0,01 M/ Tween-20) e bloqueados com 100 μ L de soro bovino fetal (SBF) 10% em PBS por 1 hora na temperatura ambiente. Após a lavagem, foram adicionados 100 μ L de plasma em cada poço. Após 2 h da incubação na temperatura ambiente, os poços foram lavados e incubados com 100 μ L (2mg/mL) de anticorpo monoclonal biotinilado de anti-IL-1 β e anti-IL-6, e posteriormente incubados com os anticorpos secundários apropriados por 1 hora na temperatura ambiente e a seguir realizada uma lavagem final. A reação foi desenvolvida pela adição do substrato TMB (3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina) em cada poço e interrompida com H₂SO₄ 1M.

As densidades ópticas foram determinadas em um leitor de microplaca usando 450nm como comprimento de onda. O índice de citocinas de cada amostra foi determinado através de uma curva de diluição seriada de padrão de citocinas expressa em pg/mL.

3.10. Determinação de LTB₄ plasmático

Quinhentos microlitros (500 μ L) do plasma foram desproteinizados e em

seguida as concentrações de LTB₄ plasmáticas foram determinadas por ELISA. Uma placa pré-coberta com anticorpo contra LTB₄ é fornecida pelo fabricante. Um volume de 50 ml/poço dos padrões e das amostras foi adicionados aos poços apropriados. Em seguida, uma solução de LTB₄ conjugada à peroxidase foi adicionada (50 ml/poço) e a placa contendo os poços recoberta com parafilme e incubada a 4°C overnight. A seguir a placa foi lavada 5 vezes, e uma solução de substrato foi adicionada em cada poço (200 ml). A placa então foi recoberta e permaneceu sob agitação leve por 90 minutos, após o que foi realizada a leitura em 420nm. A extensão do desenvolvimento de cor é inversamente proporcional à quantidade de LTB₄.

3.11. Preparo das amostras hipotalâmicas para as dosagens de cis-leucotrienos.

O cérebro foi coletado, o hipotálamo removido e rapidamente limpo de sangue e tecido adiposo. A seguir foi cultivado por 1 hora a 37 °C em um frasco contendo 1mL de Krebs- Henseleit com 0,2% de glicose em um ambiente de 95% de O₂ e 5% de CO₂ ajustado a pH 7,35 a 7,40. No final da incubação o sobrenadante de cada frasco foi coletado e, cada hipotálamo foi seco com papel e pesado em balança analítica. As amostras do meio de incubação foram mantidas a - 80 °C até serem determinados os leucotrienos por ELISA.

3.12. Viabilidade de fragmentos hipotalâmicos

Para validar a viabilidade dos fragmentos hipotalâmicos, foi utilizado o método automatizado para medir a quantidade do lactato desidrogenase

liberada no meio de incubação. O aparelho utilizado para dosagem foi: YSI-2700 Select. Biochemistry Analyser.

3.13. Determinação de cis-leucotrienos no Hipotálamo

Quinhentos microlitros (500µl) do sobrenadante do hipotálamo foram utilizados para determinar as concentrações de cis-LTs hipotalâmicos por ELISA (Amersham, código: RPN 224). Uma placa pré-coberta com anticorpo contra cis-LTs é fornecida pelo fabricante. Um volume de 50 ml dos padrões e das amostras não conhecidas foi adicionado aos poços apropriados. Em seguida, uma solução de cis-LTs conjugada à peroxidase foi adicionada (50 ml/poço). A placa foi submetida à agitação leve, coberta com folha de alumínio em ambiente por 1 hora e a seguir foi lavada 3 vezes, e a seguir uma solução de substrato (TMB/H₂O₂) foi adicionada (150 ml/poço). A placa foi novamente recoberta com folha de papel alumínio e permaneceu sob agitação leve por 30 minutos. A reação enzimática foi interrompida com 100 ml/poço de solução stop (2N H₂SO₄). A placa foi lida em um leitor de micro-placa, fixado a 450 nm. A extensão do desenvolvimento de cor é inversamente proporcional à quantidade de cis-LTs. Uma regressão linear foi usada para delinear os valores da curva padrão e calcular o conteúdo de cis-LTs das amostras.

3.14. Determinação de Citocinas no Lavado Peritoneal (TNF- α IL-1 β e IL-6)

As concentrações das citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), no lavado peritoneal foram determinadas por ensaio ELISA sanduíche. Primeiramente, as placas de ELISA foram revestidas com 100µL dos anticorpos monoclonais anti-

TNF- α , anti-IL-1 β e anti-IL-6, em tampão de carbonato de sódio de 0.1M (pH 8,2) e incubadas por 18 horas na temperatura de 4°C. Os poços foram lavados com 0,1% tampão fosfato salina (PBS / Tween-20) e bloqueados com 100 μ L de soro bovino fetal (SBF) 10% em PBS por 1 hora na temperatura ambiente. Após a lavagem, foram adicionados 100 μ L do lavado peritoneal em cada poço. Após 2 h da incubação na temperatura ambiente, os poços foram lavados e incubados com 100 μ L (2mg/mL) de anticorpo monoclonal biotilado de anti-TNF- α , anti-IL-1 β e anti-IL-6, e posteriormente incubados com os anticorpos secundários apropriados por 1 hora na temperatura ambiente. Após, foi adicionado à enzima peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida realizada uma lavagem final, e a reação foi desenvolvida pela adição do substrato TMB (3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina) em cada poço. Para parar a reação foi utilizado o H₂SO₄ 1M.

As densidades ópticas foram determinadas em um leitor de microplaca usando 450nm como comprimento de onda. O índice de citocinas de cada amostra foi determinado através de uma curva de diluição seriada de padrão de citocina expressa em ng e/ou pg/mL.

3.15. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados utilizando ANOVA TWO-WAY seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. O número de animais (n) esta apresentado no texto e/ou na legenda das figuras.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do MK-886 4mg/Kg sobre o sódio sérico e hematócrito

Houve uma diminuição no sódio sérico no grupo CLP 4 horas e um aumento após 24 horas da cirurgia ($p < 0,05$). A administração de MK-886 na concentração de 4mg/Kg não causou grandes alterações no sódio sérico para nenhum dos grupos (OF e CLP), mas apenas no período de 4 horas (Figura 4).

Figura 4. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/kg sobre o sódio sérico. Valores expressos como média $\pm$ EPM. ⁺P < 0,05 comparado com 0 e 24 horas dentro do grupo. ^{*}P < 0,05 comparado com OF. ^xP < 0,05 comparado ao grupo DMSO 5%. Número de animais (n): 6 – 12 em cada período.

A sepse provocou um aumento do hematócrito em 4 horas ($p < 0,05$). A administração de MK-886 não alterou este aumento, mas provocou um aumento do hematócrito 24 horas após a sepse ($p < 0,05$). Houve uma pequena

redução do hematócrito no grupo DMSO 5% tanto para os animais OF como CLP e efeito da droga no grupo OF às 4 horas (Figura 5).

Figura 5. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/kg sobre o hematócrito. Valores expressos como média $\pm$ EPM. ⁺P < 0,05 comparado com 0 e 24 horas dentro do grupo. [≠]P < 0,05 comparado com 0 hora dentro do grupo. ^xP < 0,05 comparado ao grupo DMSO 5%. ^{*}P < 0,05 comparado com OF. n: 12 - 9 em cada período.

4.2. Efeito da administração de MK-886 4mg/Kg sobre produção de cis-leucotrienos no incubado de hipotálamo.

A análise de cis-leucotrienos produzidos no meio de incubação do hipotálamo demonstrou que parece ter ocorrido um aumento na produção de cis-leucotrienos 4 horas após a sepse, mas não foi estatisticamente significativa

($P=0,102$). A droga parece ter diminuído este aumento embora também não seja estatisticamente significativa ($P=0,053$) (Figura 6).

Figura 6. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/kg sobre a produção de cis-leucotrienos no incubado de hipotálamo. Valores expressos como média $\pm$ EPM. n: 3 - 4 em cada período.

4.3. Efeito da administração de MK-886 4mg/Kg sobre produção de lactato desidrogenase no incubado de hipotálamo.

Vinte e quatro horas após a sepse observa-se um pequeno aumento de lactato desidrogenase ($p<0,05$). A administração da droga levou a um aumento também às 4 horas. ($p<0,001$) (Figura 7).

Figura 7. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/kg sobre a lactato desidrogenase. Valores expressos como média $\pm$ EPM. $^{\alpha}P < 0,05$ comparado com 0 e 4 horas dentro do grupo. $^{\#}P < 0,05$ comparado com 0 hora dentro do grupo. $^xP < 0,001$ comparado com DMSO 5%. n: 3 - 5 em cada período.

4.4. Efeito do MK-886 4mg/Kg sobre as concentrações de TNF- α , IL-1 e IL-6 do lavado peritoneal.

A sepse induzida por CLP provocou um aumento temporal decrescente nas concentrações de TNF- α . A administração da droga aumentou ainda mais estas concentrações em 4 e 24 horas ($P < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/kg sobre as concentrações de TNF- α no lavado peritoneal. Valores expressos como média $\pm$ EPM. [≠]P < 0,05 comparado com 0 hora dentro do grupo. ^xP < 0,05 comparado ao grupo DMSO 5%. ^αP < 0,001 comparado com 0 e 4 horas. * P < 0,001 comparado com OF.n: 3 - 5 em cada período.

A sepse induzida por CLP provocou um aumento nas concentrações de IL-1 β em 4 horas ($p < 0,05$). A administração da droga MK-886 não alterou o perfil de produção dessa citocina neste grupo. A operação fictícia também aumentou as concentrações desta citocina embora com algumas diferenças temporais em relação ao CLP ($p < 0,05$). O MK-886 não alterou o perfil de produção desta citocina neste grupo (Figura 9).

Figura 9. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/kg sobre as concentrações de IL-1 β no lavado peritoneal. Valores expressos como média $\pm$ EPM. [†]P < 0,05 comparado com 0 e 24 horas dentro do grupo. ^{*}P < 0,05 comparado OF. ^αP < 0,05 comparado com 0 e 4 horas dentro do grupo. n: 4 e 5 em cada período.

Quanto à concentração de IL-6 a sepse induzida por CLP provocou um aumento em 4 horas. Quando administrado o MK-886 induziu a um aumento adicional em 4 horas ($p < 0,05$). O grupo OF também teve um aumento às 4 horas embora menor do que o CLP e, a administração do MK-886 provocou uma ligeira redução neste mesmo período (Figura 10).

Figura 10. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/kg sobre AA

S concentrações de IL-6 no lavado peritoneal. Valores expressos como média $\pm$ EPM. ⁺P < 0,05 comparado com 0 e 24 horas dentro do grupo. ^xP < 0,05 comparado com o DMSO 5%. ^{*}P < 0,05 comparado OF. n: 4 a 6 em cada período.

4.5. Efeito da administração de MK-886 4mg/Kg sobre produção de citocinas (IL-1 β e IL-6) no plasma.

A análise dos resultados de IL-1 β plasmática no grupo CLP mostrou um aumento das concentrações em 4 horas e 24 horas (P<0,05). Quando administrada a droga, foi observada uma redução nas concentrações plasmáticas das citocinas no período de 4 horas. Em 24 horas entretanto ocorreu praticamente um bloqueio da produção destas citocinas (P<0,05) (Figura 11).

Figura 11. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/kg sobre as concentrações IL-1 β plasmáticas. Valores expressos como média $\pm$ EPM..⁺P < 0,05 comparado com 0 e 24 horas dentro do grupo.[≠]P < 0,05 comparado com 0 hora dentro do grupo.^XP < 0,05 comparado com o DMSO 5%.n:5 - 12 em cada período.

A sepse provocou um aumento das concentrações de IL-6 em 4 horas e em 24 horas. Após administração da droga foi observada uma diminuição das concentrações de IL-6 em 4 horas e um bloqueio da produção desta citosina em 24 horas ($p < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/kg sobre a IL-6 plasmático. Valores expressos como média $\pm$ EPM. ^αP < 0,05 comparado com 0 e 4 horas dentro do grupo. ⁺P < 0,05 comparado com 0 e 24 horas dentro do grupo. ^xP < 0,05 comparado com o DMSO 5%. n: 2 – 12 em cada período.

4.6. Efeito da administração de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de LTB₄ plasmático.

Os resultados revelaram uma diminuição das concentrações plasmáticas do LTB₄ 24 horas após o CLP. A administração da droga MK-886 reduziu a produção de leucotrieno em 4 horas (p<0,05), mas não alterou em 24 horas (Figura 13).

Figura 13. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/kg sobre as concentrações de LTB₄ plasmático. Valores expressos como média ± EPM. ^βP < 0,05 comparado com 4 horas dentro do grupo. ^x P < 0,05 comparado com o grupo DMSO 5%. n: 4 – 18 em cada período.

5. DISCUSSÃO e CONCLUSÃO

Nesse estudo, nós verificamos o efeito da administração intraperitoneal de inibidor de síntese de leucotrienos (MK-886) sobre o hematócrito, sódio, leucotrienos (cis-leucotrienos e LTB₄) além de citocinas no sítio infeccioso e no plasma de animais sépticos.

Todos os animais submetidos à cirurgia CLP desenvolveram sintomas de sepse, dentre eles: piloereção, letargia e diarreia, conforme já observado em estudos anteriores deste laboratório (MARTINS *et al.*, 2011; CORREA *et al.*, 2007; ATHAYDE *et al.*, 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009).

Ocorreu uma redução significativa nas concentrações de sódio 4 horas após a cirurgia CLP que pode ser explicada pelo aumento da ingestão hídrica e nenhuma alteração na diurese, resultados anteriormente observados no laboratório neste mesmo período. Isto nos levou a sugerir que conforme já relatado, pode estar acontecendo uma diluição do fluido corporal que resultaria nesta redução do sódio sérico (CORREA *et al.*, 2007; OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009).

Observamos um aumento do hematócrito 4 horas após a cirurgia CLP, e o MK-886 não modificou esse aumento, demonstrando que a droga não altera a hipovolemia decorrente da sepse.

A hipovolemia é uma alteração fisiológica freqüentemente presente na fase inicial da sepse, devido ao extravasamento de líquido e proteínas intravasculares para o interstício e cavidade peritoneal. Esse fenômeno ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular ocasionada pela produção de mediadores inflamatórios, dentro os quais TNF- α , IL-1, IL-6, NO e os LTs (ANDREW *et al.*, 2000; FISHEL *et al.*, 2003; BENJAMIM *et al.*, 2005). Esse resultado já foi anteriormente observado em nosso laboratório com o modelo

de sepse por CLP com 10 e 20 furos no ceco (ATHAYDE *et al.*, 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009).

A produção hipotalâmica de cis-leucotrienos não mostrou alterações estatisticamente significantes, tanto nos animais controles (DMSO 5%), quanto nos tratados com MK-886, embora tenhamos observado uma tendência de aumento 4 horas após a sepse e que foi aparentemente reduzido com a droga. Nossa hipótese é que talvez a dose de 4mg da droga administrada intraperitonealmente não foi capaz de bloquear totalmente a produção de cis-leucotrienos centralmente.

A via de administração, portanto deve ter contribuído para que esses resultados fossem aparentemente diferentes dos obtidos em estudos prévios quando a droga foi administrada centralmente e verificou-se bloqueio da LTC₄ sintase (ATHAYDE *et al.*, 2009). Embora não foi verificada a produção hipotalâmica de cis-leucotrienos como no presente trabalho. Vale ressaltar que a administração desta droga por ambas as vias (intracerebroventricular e intraperitoneal) foi capaz de reduzir ou bloquear a secreção de vasopressina de maneira dose-dependente conforme demonstramos em trabalhos anteriores do laboratório e que acabaram inspirando este presente trabalho (MARTINS *et al.*; ATHAYDE *et al.*, 2009). Adicionalmente foi visto que os cis-leucotrienos plasmáticos não se alteraram quando a droga MK-886 foi administrada intraperitonealmente (MARTINS *et al.*, 2011).

Os hipotálamos foram considerados viáveis, pois foi verificada a produção de lactato desidrogenase em ambos os grupos embora em maior quantidade 24 horas após a sepse. Alguns trabalhos relatam que os níveis de lactato no cérebro aumentam durante a sepse, devido à utilização da via

anaeróbica (SCHURR e RIGOR, 1998; SCHURR, 2002; GLADDEN, 2004). Quando administrado MK-886 este aumento ocorreu já às 4 horas após a sepse. Nossa justificativa para esse aumento é que a droga pode estar fazendo com que os hipotálamos, na tentativa de se manterem vivos, utilizem as duas vias aeróbicas e anaeróbicas para conseguir energia.

A análise das citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) no **sítio infeccioso**, mostrou um perfil esperado de liberação durante o processo infeccioso (WALLEY *et al.*, 1996; EBONG *et al.*, 1999). O TNF- α mostrou um aumento na primeira hora, seguido pela diminuição progressiva até 24 horas. Já as citocinas IL-1 β e IL-6 aumentaram às 4 horas, seguido por diminuição em 24 horas após a sepse.

Vários trabalhos relatam que o TNF- α é a primeira citocina a aparecer em processos infecciosos e que suas concentrações vão diminuindo progressivamente e ao mesmo tempo em que estimula o aparecimento da IL-1 β que por sua vez afeta a produção de IL-6 (WALLEY *et al.*, 1996; EBONG *et al.*, 1999). A droga MK-886 não modificou o perfil de produção dessas citocinas, porém foi observado um aumento adicional de TNF- α em 4 e 24 horas e IL-6 em 4 horas em relação ao grupo controle (DMSO 5%). Resultados semelhantes foram observados em modelo de infecção por histoplasmoses embora a droga tenha sido administrada oralmente (MEDEIROS *et al.*, 2004). Neste trabalho os autores sugerem que a ausência dos leucotrienos ocasionados pela administração de MK-886 na infecção diminuiria a ação antimicrobiana permitindo a proliferação dos microorganismos no sítio infeccioso, que por sua vez induziria um constante recrutamento das células imunes que seriam responsáveis pelo aumento das citocinas. Além disso, esse aumento seria independente da produção de leucotrienos. (MEDEIROS *et al.*,

2004). Entretanto, foi verificado em nosso laboratório que a migração de neutrófilos para o foco infeccioso não é afetada quando administrado o MK-886 intraperitonealmente (MARTINS *et al.*, 2011).

Diante destes resultados, resolvemos verificar como estaria a produção dessas **citocinas no plasma**. A análise do TNF- α não foi possível, pois os níveis plasmáticos são muito baixos e indetectáveis pelo ensaio. Estudos com camundongos relataram que de fato o TNF- α pode estar presente no plasma após sepse, porém em concentrações muito baixas (EBONG *et al.*, 1999). Já para as citocinas IL-1 β e IL-6 observamos aumento as 4 e 24 horas e que diminuiu acentuadamente após a administração da droga MK-886. Sendo assim os efeitos da droga MK-886 sobre a produção dessas citocinas no plasma mostraram-se contrário ao observado no sítio infeccioso. Esta diminuição poderia ser explicada pelo fato que no plasma a quantidade de células imunes pode estar diminuída, ocasionando um aumento muito menor de citocinas comparado ao sítio. Quando administrado MK-886 as citocinas diminuíram mais ainda, pois deve ter ocorrido uma diminuição menor dos leucotrienos do que aquela ocasionada no sítio infeccioso.

Trabalhos prévios do laboratório mostraram que no plasma não ocorre grandes alterações nas concentrações de cis-leucotrienos. (MARTINS *et al.*, 2011). Já é conhecido que as principais células relacionadas com os mecanismos de defesa do hospedeiro são neutrófilos circulantes (RIOS-SANTOS *et al.*, 2003). Esses leucócitos quando ativados secretam como o seu principal produto via padrão 5-LO, o LTB₄, podendo, deste modo, ocorrer alteração da produção do LTB₄ ao invés de cis-leucotrienos (HENDERSON e KLEBANOFF, 1983; FIGUEROA *et al.*, 2003).

Diante disso, decidimos verificar o efeito da administração de MK-886 nas concentrações plasmáticas de LTB₄ durante a sepse. Verificamos que a droga diminuiu as concentrações do leucotrieno LTB₄ 4 horas após a sepse. Não sabemos como se encontram as concentrações deste leucotrieno no sítio infeccioso, mas uma diminuição poderia explicar a redução plasmática de citocinas que ocorreu com a administração do MK-886.

Este leucotrieno foi visto aumentar a expressão de TNF- α e IL1- β tanto em nível de RNA mensageiro quanto de proteína (XU *et al.*, 2009). Além disso, o LTB₄ aumenta a atividade do NF-KB, um fator de transcrição nuclear responsável pela produção de vários genes de mediadores inflamatórios (SANCHEZ-GALAN *et al.*, 2009). Essas citocinas (TNF- α , IL1- β e IL-6) podem influenciar a secreção de AVP (BROOKS e GIBSON, 1992; LANDGRAF *et al.*, 1995, PALIN *et al.*, 2009).

Dessa maneira o leucotrieno LTB₄ pode indiretamente ser responsável pela liberação de AVP via ativação de NF-KB, e produção de citocinas e, a sua inibição por MK-886 pode contribuir para a redução ou bloqueio do hormônio durante a fase inicial da sepse.

Em síntese, nossos resultados demonstraram que o sódio sérico diminuiu, o hematócrito aumentou e os cis-leucotrienos hipotalâmicos não apresentaram alterações significantes após 4 horas de CLP. A sepse provocou um aumento nas concentrações de TNF- α , no sítio infeccioso, mas não foi detectada no plasma. As citocinas IL-1 β e a IL-6 aumentaram em 4 horas tanto no sítio infeccioso como no plasma e as concentrações de LTB₄ plasmático apresentaram-se diminuídas 24 horas após o CLP. A administração do MK-886

não modificou o sódio, o hematócrito e aparentemente nem os cis-leucotrienos hipotalâmicos. No sítio infeccioso a droga causou um aumento nas concentrações de TNF- α 4 e 24 horas e de IL-6 apenas 4 horas após o CLP. Já as concentrações de IL-1 β não se modificaram. No plasma a IL-1 β e IL-6 diminuíram em 4 e 24 horas. Adicionalmente as concentrações plasmáticas de LTB₄ reduziram em 4 horas.

Conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que os leucotrienos regulam de maneira diferente a produção de citocinas no plasma e no foco infeccioso e podem explicar os efeitos destes mediadores na secreção de vasopressina durante a sepse.

REFERÊNCIAS

- Abramovitz, M., E. Wong, *et al.* 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. **Eur J Biochem**, v.215, n.1, Jul 1, p.105-11. 1993.
- Aderem, A. e R. J. Ulevitch. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v.406, n.6797, Aug 17, p.782-7. 2000.
- Anderson, M. R. e J. L. Blumer. Prognostic markers in sepsis: the role of leukotrienes. **Crit Care Med**, v.28, n.11, Nov, p.3762-3. 2000.
- Andrew, P., Y. Deng, *et al.* Fluid extravasation from spleen reduces blood volume in endotoxemia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.278, n.1, Jan, p.R60-5. 2000.
- Angus, D. C. e R. S. Wax. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med**, v.29, n.7 Suppl, Jul, p.S109-16. 2001.
- Al-Amran, F. G., N. R. Hadi, *et al.* Leukotriene biosynthesis inhibition ameliorates acute lung injury following hemorrhagic shock in rats. **J Cardiothorac Surg**, v.6, p.81.
- Athayde, L. A., G. R. Oliveira-Pelegrin, *et al.* Blocking central leukotrienes synthesis affects vasopressin release during sepsis. **Neuroscience**, v.160, n.4, Jun 2, p.829-36. 2009.
- Barberis, C., B. Mouillac, *et al.* Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. **J Endocrinol**, v.156, n.2, Feb, p.223-9. 1998.
- Benjamim, C. F., C. Canetti, *et al.* Opposing and Hierarchical Roles of Leukotrienes in Local Innate Immune versus Vascular Responses in a Model of Sepsis. **J Immunol**, v.174, n.3, Feb 1, p.1616-20. 2005.
- Benjamim, C. F., S. H. Ferreira, *et al.* Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis**, v.182, n.1, Jul, p.214-23. 2000.
- Berczi, I., A. Quintanar-Stephano, *et al.* Neuroimmune regulation in immunocompetence, acute illness, and healing. **Ann N Y Acad Sci**, v.1153, Feb, p.220-39. 2009.
- Bone, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med**, v.115, n.6, Sep 15, p.457-69. 1991.
- Bone, R. C., R. A. Balk, *et al.* 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**, v.101, n.6, Jun, p.1644-55. 1992.

- Bone, R. C., C. J. Grodzin, *et al.* Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v.112, n.1, Jul, p.235-43. 1997.
- Borges, B. C. e M. J. Da Rocha. Participation of the subfornical nucleus in hypothalamic-neurohypophyseal axis activation during the early phase of endotoxic shock. **Neurosci Lett**, v.404, n.1-2, Aug 14, p.227-31. 2006.
- Bozza, F. A., J. I. Salluh, *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Crit Care**, v.11, n.2, p.R49. 2007.
- Brach, M. A., S. De Vos, *et al.* Leukotriene B4 transcriptionally activates interleukin-6 expression involving NK-chi B and NF-IL6. **Eur J Immunol**, v.22, n.10, Oct, p.2705-11. 1992.
- Brooks, A. N. e F. Gibson. Prostaglandin E2 enhances AVP-stimulated but not CRF-stimulated ACTH secretion from cultured fetal sheep pituitary cells. **J Endocrinol**, v.132, n.1, Jan, p.33-8. 1992.
- Can, C., M. G. Cinar, *et al.* Effects of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, in a rabbit model of endotoxic shock. **Eur J Pharmacol**, v.350, n.2-3, Jun 5, p.223-8. 1998.
- Ciana, P., M. Fumagalli, *et al.* The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. **EMBO J**, v.25, n.19, Oct 4, p.4615-27. 2006.
- Clark, J. D., A. R. Schievella, *et al.* Cytosolic phospholipase A2. **J Lipid Mediat Cell Signal**, v.12, n.2-3, Oct, p.83-117. 1995.
- Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.885-91. 2002.
- Correa, P. B., J. A. Pancoto, *et al.* Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, v.183, n.1-2, Feb, p.17-25. 2007.
- Dahlen, S. E., J. Bjork, *et al.* Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.78, n.6, Jun, p.3887-91. 1981.
- Dahlen, S. E., P. Hedqvist, *et al.* Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. **Nature**, v.288, n.5790, Dec 4, p.484-6. 1980.
- De Carvalho Borges, B., E. C. Carnio, *et al.* Lesion of the anteroventral third ventricle (AV3V) reduces hypothalamic activation and hypophyseal hormone secretion induced by lipopolysaccharide in rats. **Brain Res**, v.1115, n.1, Oct 18, p.83-91. 2006.

- De Laurentiis, A., J. Fernandez Solari, *et al.* Endocannabinoid system participates in neuroendocrine control of homeostasis. **Neuroimmunomodulation**, v.17, n.3, p.153-6.
- Dejager, L., I. Pinheiro, *et al.* Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends Microbiol**, v.19, n.4, Apr, p.198-208.
- Dellinger, R. P., M. M. Levy, *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Crit Care Med**, v.36, n.1, Jan, p.296-327. 2008.
- Ebong, S., D. Call, *et al.* Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. **Infect Immun**, v.67, n.12, Dec, p.6603-10. 1999.
- Echtenacher, B., M. A. Freudenberg, *et al.* Differences in innate defense mechanisms in endotoxemia and polymicrobial septic peritonitis. **Infect Immun**, v.69, n.12, Dec, p.7271-6. 2001.
- Engblom, D., M. Ek, *et al.* Induction of microsomal prostaglandin E synthase in the rat brain endothelium and parenchyma in adjuvant-induced arthritis. **J Comp Neurol**, v.452, n.3, Oct 21, p.205-14. 2002.
- Erlenbach, I. e J. Wess. Molecular basis of V2 vasopressin receptor/Gs coupling selectivity. **J Biol Chem**, v.273, n.41, Oct 9, p.26549-58. 1998.
- Feinmark, S. J. e P. J. Cannon. Endothelial cell leukotriene C4 synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A4 synthesized by polymorphonuclear leukocytes. **J Biol Chem**, v.261, n.35, Dec 15, p.16466-72. 1986.
- Flamand, N., P. Mancuso, *et al.* Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. **Cell Mol Life Sci**, v.64, n.19-20, Oct, p.2657-70. 2007.
- Freise, H., U. B. Bruckner, *et al.* Animal models of sepsis. **J Invest Surg**, v.14, n.4, Jul-Aug, p.195-212. 2001.
- Figueroa, D. J., L. Borish, *et al.* Expression of cysteinyl leukotriene synthetic and signalling proteins in inflammatory cells in active seasonal allergic rhinitis. **Clin Exp Allergy**, v.33, n.10, Oct, p.1380-8. 2003.
- Fishel, R. S., C. Are, *et al.* Vessel injury and capillary leak. **Crit Care Med**, v.31, n.8 Suppl, Aug, p.S502-11. 2003.
- Frink, M., M. Van Griensven, *et al.* IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries. **Scand J Trauma Resusc Emerg Med**, v.17, p.49. 2009.

- Gladden, L. B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **J Physiol**, v.558, n.Pt 1, Jul 1, p.5-30. 2004.
- Ghorbel, M. T., G. Sharman, *et al.* Microarray analysis reveals interleukin-6 as a novel secretory product of the hypothalamo-neurohypophyseal system. **J Biol Chem**, v.278, n.21, May 23, p.19280-5. 2003.
- Giusti-Paiva, A., L. G. Branco, *et al.* Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflugers Arch**, v.447, n.2, Nov, p.175-80. 2003.
- Gonzalez-Hernandez, T., D. Afonso-Oramas, *et al.* Interleukin-6 and nitric oxide synthase expression in the vasopressin and corticotrophin-releasing factor systems of the rat hypothalamus. **J Histochem Cytochem**, v.54, n.4, Apr, p.427-41. 2006.
- Goulet, J. L., R. S. Byrum, *et al.* Genetic factors determine the contribution of leukotrienes to acute inflammatory responses. **J Immunol**, v.164, n.9, May 1, p.4899-907. 2000.
- Heise, C. E., B. F. O'dowd, *et al.* Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. **J Biol Chem**, v.275, n.39, Sep 29, p.30531-6. 2000.
- Henderson, L. A., K. A. Keay, *et al.* The ventrolateral periaqueductal gray projects to caudal brainstem depressor regions: a functional-anatomical and physiological study. **Neuroscience**, v.82, n.1, Jan, p.201-21. 1998.
- Henderson, W. R. e S. J. Klebanoff. Leukotriene production and inactivation by normal, chronic granulomatous disease and myeloperoxidase-deficient neutrophils. **J Biol Chem**, v.258, n.22, Nov 25, p.13522-7. 1983.
- Hirabayashi, T. e T. Shimizu. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). **Biochim Biophys Acta**, v.1488, n.1-2, Oct 31, p.124-38. 2000.
- Holmes, C. L., B. M. Patel, *et al.* Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. **Chest**, v.120, n.3, Sep, p.989-1002. 2001.
- Holmes, C. L., J. A. Russell, *et al.* Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. **Chest**, v.124, n.3, Sep, p.1103-15. 2003.
- Hopkins, S. J. e N. J. Rothwell. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. **Trends Neurosci**, v.18, n.2, Feb, p.83-8. 1995.
- Hui, Y. e C. D. Funk. Cysteinyl leukotriene receptors. **Biochem Pharmacol**, v.64, n.11, Dec 1, p.1549-57. 2002.

- Hulting, A. L., J. A. Lindgren, *et al.* Leukotriene C4 as a mediator of luteinizing hormone release from rat anterior pituitary cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82, n.11, Jun, p.3834-8. 1985.
- Innamorati, G., H. Sadeghi, *et al.* A fully active nonglycosylated V2 vasopressin receptor. **Mol Pharmacol**, v.50, n.3, Sep, p.467-73. 1996.
- Kamohara, M., J. Takasaki, *et al.* Functional characterization of cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor on human coronary artery smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.287, n.5, Oct 12, p.1088-92. 2001.
- Lam, B. K.; Penrose, J. F.; Freeman, G. J.; Austen, K. F. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.16, Aug 2, p.7663-7. 1994.
- Lammers, C. H., P. Schweitzer, *et al.* Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression and role in somatostatin signaling. **J Neurochem**, v.66, n.1, Jan, p.147-52. 1996.
- Landry, D. W. e J. A. Oliver. The pathogenesis of vasodilatory shock. **N Engl J Med**, v.345, n.8, Aug 23, p.588-95. 2001.
- Landgraf, R., I. Neumann, *et al.* Interleukin-1 beta stimulates both central and peripheral release of vasopressin and oxytocin in the rat. **Eur J Neurosci**, v.7, n.4, Apr 1, p.592-8. 1995.
- Lecca, D., M. L. Trincavelli, *et al.* The recently identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair. **PLoS One**, v.3, n.10, p.e3579. 2008.
- Levy, M. M., M. P. Fink, *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med**, v.29, n.4, Apr, p.530-8. 2003.
- Lindgren, J. A., T. Hokfelt, *et al.* Leukotrienes in the rat central nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.81, n.19, Oct, p.6212-6. 1984.
- Lynch, K. R., G. P. O'Neill, *et al.* Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. **Nature**, v.399, n.6738, Jun 24, p.789-93. 1999.
- Mancini, J. A., M. Abramovitz, *et al.* 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. **FEBS Lett**, v.318, n.3, Mar 8, p.277-81. 1993.
- Marshall, L. A., R. H. Hall, *et al.* SB 203347, an inhibitor of 14 kDa phospholipase A2, alters human neutrophil arachidonic acid release and

- metabolism and prolongs survival in murine endotoxin shock. **J Pharmacol Exp Ther**, v.274, n.3, Sep, p.1254-62. 1995.
- Martin, G. S., D. M. Mannino, *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, v.348, n.16, Apr 17, p.1546-54. 2003.
- Martin, V., N. Sawyer, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of murine cysteinyl-leukotriene 1 (CysLT(1)) receptors. **Biochem Pharmacol**, v.62, n.9, Nov 1, p.1193-200. 2001.
- Martins, T. F., C. A. Sorgi, *et al.* Leukotriene synthesis inhibitor decreases vasopressin release in the early phase of sepsis. **J Neuroimmunol**, v.238, n.1-2, Sep 15, p.52-7.
- Mastorakos, G., J. S. Weber, *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and stimulation of systemic vasopressin secretion by recombinant interleukin-6 in humans: potential implications for the syndrome of inappropriate vasopressin secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, v.79, n.4, Oct, p.934-9. 1994.
- Matsunaga, W., S. Miyata, *et al.* LPS-induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus. **Brain Res**, v.858, n.1, Mar 6, p.9-18. 2000.
- Mccann, S. M., M. Kimura, *et al.* The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. **Ann N Y Acad Sci**, v.917, p.4-18. 2000.
- Medeiros, A. I., A. Sa-Nunes, *et al.* Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infect Immun**, v.72, n.3, Mar, p.1637-44. 2004.
- Medzhitov, R. e C. A. Janeway, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v.91, n.3, Oct 31, p.295-8. 1997.
- Miller, D. K., J. W. Gillard, *et al.* Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. **Nature**, v.343, n.6255, Jan 18, p.278-81. 1990.
- Miyamoto, T., J. A. Lindgren, *et al.* Regional distribution of leukotriene and mono-hydroxyeicosatetraenoic acid production in the rat brain. Highest leukotriene C4 formation in the hypothalamus. **FEBS Lett**, v.216, n.1, May 25, p.123-7. 1987.
- Morlion, B. J., E. Torwesten, *et al.* Cysteinyl-leukotriene generation as a biomarker for survival in the critically ill. **Crit Care Med**, v.28, n.11, Nov, p.3655-8. 2000.
- Nemzek, J. A., H. Y. Xiao, *et al.* Humane endpoints in shock research. **Shock**,

v.21, n.1, Jan, p.17-25. 2004.

Oliveira-Pelegrin, G. R., M. I. Ravanelli, *et al.* Thermoregulation and vasopressin secretion during polymicrobial sepsis. **Neuroimmunomodulation**, v.16, n.1, Jan, p.45-53. 2009.

Palin, K., M. L. Moreau, *et al.* Interleukin-6 activates arginine vasopressin neurons in the supraoptic nucleus during immune challenge in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.296, n.6, Jun, p.E1289-99. 2009.

Pancoto, J. A., P. B. Correa, *et al.* Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Auton Neurosci**, v.138, n.1-2, Feb 29, p.57-63. 2008.

Penrose, J. F.; Gagnon, L.; Goppelt-Struebe, M.; Myers, P.; Lam, B. K.; Jack, R. M.; Austen, K. F.; Soberman, R. J. Purification of human leukotriene C4 synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.23, Dec 1, p.11603-6. 1992.

Quinn, J. V. e G. J. Slotman. Platelet-activating factor and arachidonic acid metabolites mediate tumor necrosis factor and eicosanoid kinetics and cardiopulmonary dysfunction during bacteremic shock. **Crit Care Med**, v.27, n.11, Nov, p.2485-94. 1999.

Read, R. C. e D. H. Wyllie. Toll receptors and sepsis. **Curr Opin Crit Care**, v.7, n.5, Oct, p.371-5. 2001.

Remick, D. G., D. E. Newcomb, *et al.* Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, v.13, n.2, Feb, p.110-6. 2000.

Rios-Santos, F., C. F. Benjamim, *et al.* A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. **Shock**, v.19, n.1, Jan, p.61-5. 2003.

Rola-Pleszczynski, M. e J. Stankova. Leukotriene B4 enhances interleukin-6 (IL-6) production and IL-6 messenger RNA accumulation in human monocytes in vitro: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **Blood**, v.80, n.4, Aug 15, p.1004-11. 1992.

Sanchez-Galan, E., A. Gomez-Hernandez, *et al.* Leukotriene B4 enhances the activity of nuclear factor-kappaB pathway through BLT1 and BLT2 receptors in atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, v.81, n.1, Jan 1, p.216-25. 2009.

Sands, K. E., D. W. Bates, *et al.* Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. **JAMA**, v.278, n.3, Jul 16, p.234-40. 1997.

- Sarau, H. M., R. S. Ames, *et al.* Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. **Mol Pharmacol**, v.56, n.3, Sep, p.657-63. 1999.
- Scheiermann, P., S. Hoegl, *et al.* Comparing hemodynamics, blood gas analyses and proinflammatory cytokines in endotoxemic and severely septic rats. **Int Immunopharmacol**, v.11, n.6, Jun, p.719-23.
- Schurr, A. e B. M. Rigor. Brain anaerobic lactate production: a suicide note or a survival kit? **Dev Neurosci**, v.20, n.4-5, p.348-57. 1998.
- Schurr, A. Lactate, glucose and energy metabolism in the ischemic brain (Review). **Int J Mol Med**, v.10, n.2, Aug, p.131-6. 2002.
- Sharshar, T., A. Blanchard, *et al.* Circulating vasopressin levels in septic shock. **Crit Care Med**, v.31, n.6, Jun, p.1752-8. 2003.
- Shimada, A., M. Satoh, *et al.* Highly selective localization of leukotriene C4 synthase in hypothalamic and extrahypothalamic vasopressin systems of mouse brain. **Neuroscience**, v.131, n.3, p.683-9. 2005.
- Silva, E. **Sepse: Manual**: São Paulo: Atheneu. 2006
- Slotman, G. J., B. Friedman, *et al.* Interleukin-1 mediates increased plasma levels of eicosanoids and cytokines in patients with sepsis syndrome. **Shock**, v.4, n.5, Nov, p.318-23. 1995.
- Slotman, G. J., J. V. Quinn, *et al.* Unopposed interleukin-1 is necessary for increased plasma cytokine and eicosanoid levels to develop in severe sepsis. **Ann Surg**, v.226, n.1, Jul, p.77-84. 1997.
- Sogayar, A. M., F. R. Machado, *et al.* A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, v.26, n.5, p.425-34. 2008.
- Sriskandan, S. e D. M. Altmann. The immunology of sepsis. **J Pathol**, v.214, n.2, Jan, p.211-23. 2008.
- Stove, S., T. Welte, *et al.* Circulating complement proteins in patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.3, n.2, Mar, p.175-83. 1996.
- Swaab, D. F., F. Nijveldt, *et al.* Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. **J Endocrinol**, v.67, n.3, Dec, p.461-2. 1975.
- Teles, J. M., E. Silva, *et al.* Surviving sepsis campaign in Brazil. **Shock**, v.30 Supl 1, Oct, p.47-52. 2008.

- Thibonnier, M., J. A. Preston, *et al.* The human V3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways. **Endocrinology**, v.138, n.10, Oct, p.4109-22. 1997.
- Toda, A., T. Yokomizo, *et al.* Cloning and characterization of rat leukotriene B(4) receptor. **Biochem Biophys Res Commun**, v.262, n.3, Sep 7, p.806-12. 1999.
- Villa, P., G. Sartor, *et al.* Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.2, n.5, Sep, p.549-53. 1995.
- Walley, K. R., N. W. Lukacs, *et al.* Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infect Immun**, v.64, n.11, Nov, p.4733-8. 1996.
- Wood, C. E. e H. G. Chen. Acidemia stimulates ACTH, vasopressin, and heart rate responses in fetal sheep. **Am J Physiol**, v.257, n.2 Pt 2, Aug, p.R344-9. 1989.
- Xia, Y. e T. L. Krukoff. Cardiovascular responses to subseptic doses of endotoxin contribute to differential neuronal activation in rat brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v.89, n.1-2, Apr 18, p.71-85. 2001.
- Xu, S., H. Lu, *et al.* Regulation of TNF α and IL1 β in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B4. **Rheumatol Int**, v.30, n.9, Jul, p.1183-9.
- Yokomizo, T., K. Kato, *et al.* Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. **J Biol Chem**, v.276, n.15, Apr 13, p.12454-9. 2001.
- Yokomizo, T., K. Kato, *et al.* A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **J Exp Med**, v.192, n.3, Aug 7, p.421-32. 2000.

Tabela 1. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o Sódio (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 4.

Tempo (h)	Grupos									
	DMSO 5%					MK-886 (4mg/kg)				
	OF		CLP			OF		CLP		
	M ± EPM	n	M ± EPM	n		M ± EPM	n	M ± EPM	n	
0	139,1 ± 2,5	12	140,2 ± 2,8	11		137,3 ± 1,7	12	139,4 ± 2,1	11	
4	128,0 ± 3,7	11	129,3 ± 2,9	10		129,5 ± 4,7	12	126,9 ± 4,5	10	
24	138,4 ± 2,0	11	138,0 ± 1,6	11		136,7 ± 2,5	11	148,6 ± 3,3	6	

Tabela 2. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o Hematócrito. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 5.

Tempo (h)	Grupos									
	DMSO 5%					MK-886 (4mg/kg)				
	OF		CLP		OF		CLP			
	M ± EPM	n	M ± EPM	n	M ± EPM	n	M ± EPM	n	M ± EPM	n
0	49,9±2,6	12	48,3±3,2	12	48,6±1,7	12	48,8±1,9	11		
4	47,7±3,6	11	53,3±3,0	9	44,7±5,9	12	52,7±1,6	11		
24	45,0±2,8	12	45,7±5,1	11	45,0±2,8	11	50,8±4,3	10		

Tabela 3. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre as concentrações de cis-leucotrienos centrais. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 6.

Grupos										
Tempo (h)	DMSO 5%					MK-886 (4mg/kg)				
	OF		CLP			OF		CLP		
	M ± EPM	n	M ± EPM	n	n	M ± EPM	n	M ± EPM	n	n
0	0,60±0,08	3	0,63±0,12	3	3	0,42±0,04	3	0,57±0,09	3	3
4	0,68±0,11	3	0,89±0,12	3	3	0,45±0,05	3	0,56±0,06	3	3
24	0,50±0,09	3	0,57±0,10	3	3	0,24±0,07	3	0,39±0,02	3	4

Tabela 4. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre o lactato desidrogenase. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 7.

Grupos										
Tempo (h)	DMSO 5%					MK-886 (4mg/kg)				
	OF		CLP			OF		CLP		
	M ± EPM	n	M ± EPM	n	n	M ± EPM	n	M ± EPM	n	n
0	2,5± 0,02	3	2,6±0,1	3	3	2,6±0,06	3	2,4±0,1	3	3
4	2,7±0,07	4	2,5±0,05	5	5	2,8±0,2	3	3,6± 0,3	3	3
24	3,0±0,1	4	3,0±0,1	5	5	2,8±0,4	3	3,1±0,07	3	3

Tabela 5. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de TNF- α no lavado peritoneal. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 9.

Grupos									
Tempo (h)	DMSO 5%					MK-886 (4mg/kg)			
	OF		CLP			OF		CLP	
	M $\pm$ EPM	<i>n</i>	M $\pm$ EPM	<i>n</i>	M $\pm$ EPM	M $\pm$ EPM	<i>n</i>	M $\pm$ EPM	<i>n</i>
0	72,5 $\pm$ 8,8	3	416,9 $\pm$ 12,8	4	30,7 $\pm$ 9,2	5	378,2 $\pm$ 19,9	3	
4	19,9 $\pm$ 4,5	3	214,5 $\pm$ 22,9	3	16,1 $\pm$ 16,1	4	297,8 $\pm$ 19,2	5	
24	2.1 $\pm$ 2,1	5	49,6 $\pm$ 6.8	3	1,7 $\pm$ 1,7	5	159,8 $\pm$ 43,2	4	

Tabela 6. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de IL-1 β no lavado peritoneal . Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 8.

Grupos									
Tempo (h)	DMSO 5%					MK-886 (4mg/kg)			
	OF		CLP			OF		CLP	
	M $\pm$ EPM	<i>n</i>	M $\pm$ EPM	<i>n</i>	M $\pm$ EPM	M $\pm$ EPM	<i>n</i>	M $\pm$ EPM	<i>n</i>
0	10,4 $\pm$ 0,3	4	9,5 $\pm$ 1,3	5	7,9 $\pm$ 1,1	3	13,3 $\pm$ 0,8	3	
4	38,1 $\pm$ 6,9	4	66,8 $\pm$ 3,7	4	47,3 $\pm$ 5,1	3	54,8 $\pm$ 6,9	3	
24	16,9 $\pm$ 1,7	4	2,5 $\pm$ 0,7	5	26,9 $\pm$ 1,3	4	6,7 $\pm$ 3,8	4	

Tabela 7. Efeito da administração sistêmica de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de IL-6 no lavado peritoneal. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 10.

Tempo (h)		Grupos					
		DMSO 5%			MK-886 (4mg/kg)		
		OF		CLP	OF		CLP
		M ± EPM	n	M ± EPM	n	M ± EPM	n
0		160,4±45,1	5	98,0±7,0	5	653,6±63,2	4
4		25663,4±2689,2	5	52117,0±6589,0	3	15058,0±1629,3	4
24		303,8±72,0	6	2141,3±319,3	5	587,1±197,8	8

Tabela 8. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de IL-1β plasmático. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 11.

Tempo (h)		Grupos					
		DMSO 5%			MK-886 (4mg/kg)		
		OF		CLP	OF		CLP
		M ± EPM	n	M ± EPM	n	M ± EPM	n
0		0,0±0,0	6	0,0±0,0	11	0,0±0,0	6
4		9,0±9,0	6	549,8±68,5	6	0,0±0,0	6
24		0,0±0,0	6	501,3±105,0	5	0,0±0,0	6

Tabela 9. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre a produção de IL-6 plasmático. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 12.

Grupos									
Tempo (h)	DMSO 5%				MK-886 (4mg/kg)				
	OF		CLP		OF		CLP		
	M ± EPM	n	M ± EPM	n	M ± EPM	n	M ± EPM	n	n
0	0,0±0,0	4	0,0±0,0	7	0,68±0,68	4	0,0±0,0		5
4	28,3±15,7	3	1572,0±188,5	12	50,7±2,6	2	1058,8±161,9		10
24	0,0±0,0	4	2900,9±481,6	3	0,0±0,0	4	19,7±13,3		3

Tabela 10. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 4mg/Kg sobre a concentração de LTB₄ plasmático. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 13.

Grupos					
Tempo (h)	DMSO 5%		MK-886 (4mg/kg)		
	CLP		CLP		
	M ± EPM	n	M ± EPM	n	n
4	5,4±0,33	18			4,4±0,42 15
24	2,0±0,41	5			2,3±0,16 4

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.370.53.5), intitulado "Efeito do MK-886 sobre a Produção de Leucotrienos Centrais e de Citocinas no Plasma de Animais Sépticos", de autoria de **Juliana Borges Pereira** e de **Maria José Alves da Rocha** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05/08/2010.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.370.53.5), entitled: "Efeito do MK-886 sobre a Produção de Leucotrienos Centrais e de Citocinas no Plasma de Animais Sépticos", by **Juliana Borges Pereira** and **Maria José Alves da Rocha**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, August 05, 2010.

Ribeirão Preto, 9 de agosto de 2010.

Presidente da CEUA

Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA

Maria Angélica Depiro