FRANCISCO GARCIA SORIANO

SEPSE:

ESTUDOS DAS ALTERAÇÕES CELULARES, TECIDUAIS E ORGÂNICAS

PRODUZIDAS POR MODELOS DE SEPSE EXPERIMENTAL.

ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS E EXPRESSÃO GÊNICA

Texto sistematizado apresentado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Professor Livre-Docente junto ao Departamento de Clínica Médica (Disciplina de Emergências Clínicas)

São Paulo

2006

Aos meus pais – Maria Eloisa e Oscar – pela eterno apoio.

A Clara, minha esposa, pelo que é imensurável.

**Aos meus filhos, Victor e Felipe, que transbordam alegria e são
a nova ordem da minha vida**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco, Professor Titular da Disciplina de Emergências Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, pelo apoio, estímulo e orientação.

Ao Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo, superintendente do Hospital Universitário, pelo apoio no trabalho junto a UTI do HU.

A Dra. Marcia Silveira Martins Bernik, Diretora da Divisão de Clínica Médica do HU, pelo apoio desde dos tempos de graduação.

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, docente da Disciplina de Emergências Clínicas da FMUSP, pela ajuda nos trabalhos do LIM 51.

Aos colegas e amigos do LIM51

Aos colegas e amigos do Hospital Universitário

Aos colegas e amigos das UTIs do HU, do PSM e do Choque

Aos amigos e colaboradores do ICB USP

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO	2
Sepse: clínica e epidemiologia	3
Fisiopatologia da sepse	5
LPS e inflamação	6
Mecanismos moleculares de ação do LPS	9
 I - DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOTOXEMIA POR INJEÇÃO DE LPS EM MURINOS. CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E ORGÂNICAS DA ENDOTOXEMIA.	 13
I.I - ALTERAÇÕES CLÍNICAS	14
Caracterização do modelo experimental de endotoxemia	14
LPS e quadro clínico	18
I.II - LESÃO A ÓRGÃOS	20
Alterações pulmonares decorrentes da endotoxemia	20
 II - PAPEL DAS SUBSTÂNCIAS PURINÉRGICAS NA SEPSE	27
Estudos de lesão endotelial, alteração de reatividade vascular e lesão de múltiplos órgãos.	27

IV I– Papel da poli (ADP-ribose) polimerase na lesão tecidual induzida pela seps	86
IV.II. Papel da poli (ADP-ribose) polimerase na disfunção endotelial induzida pela hiperglicemia	102
V – ESTUDO DOS EFEITOS DE INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA AO LPS	119
Efeito da indução de tolerância ao LPS nas populações linfocitárias e alteração da expressão gênica	120
Estudo da expressão gênica nos linfócitos	136
ANEXO I	135
Referências	161

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP- adenosina difosfato

ALT-aspartato leucina transferase

AST- aspartato serina transferase

ATP- adenosina trifosfato

B- linfócito do tipo B

BPI- proteína de inibição bacteriana

BUN- nitrogênio urinário

cAMP- adenosina monofosfato cíclico

CAP18- família de peptídeos antibacterianos

CAP37- família de peptídeos antibacterianos

CARS – síndrome da resposta compensatória sistêmica

CD11c- molécula de membrana de linfócito

CD14- proteína detectora de LPS

CD4- linfócito tipo helper

CD40- proteína celular expressa na inflamação

CD8- linfócito tipo citotóxico

CD80- proteína expressa em linfócitos ativados, para comunicação celular

CD86- proteína expressa em linfócitos ativados, para comunicação celular

cJUN- fator de transcrição

CLP- ligadura cecal e punção

COX2- enzima ciclooxigenase 2

c-Rel- membrada família do NF- κ B

CSF- líquidocefalorraquidiano

CTL- linfócito T citotóxico

DNA- ácido desoxirribonucléico

EC50- dose que produz 50% do efeito máximo

ECAM- moléculas de adesão da célula endotelial

ECSIT- evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways

EDHF- Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

EDRF- Fator Relaxante Derivado do Endotélio

eNOS- óxido nítrico sintetase endotelial

ERK-quinase regulada extracelularmente

ERO- espécies reativas de oxigênio

FD4- dextran fluorescente peso molecular 4000 daltons

fos- família de proteínas que dimeriza com Jun para produzir AP1

g- grama

GH –hormônio do crescimento

GPI- glicosil-fosfatidil-inositol

GSH-glutationa reduzida

hck- pertence a família da tirosina quinase

HDL- lipoproteína de alta densidade

HSP- proteína ativada por choque térmico

HUVEC- cultura de células endoteliais do cordão umbilical humano

I κ B- inibidor do NF- κ B

i.p.- intraperitoneal

i.v.- intravenoso

ICAM- molécula de adesão intercelular

IGFBP-1 - IGF-binding protein-1

IL -interleucina

INF- γ - interferon gama

INOS- enzima óxido nítrico sintetase induzível

IRAK- ativador quinase IL-1 relacionado

IRS- substrato receptor de insulina

Kg- kilograma

LBP- proteína ligadora de LPS

LNAME- N^G nitro L- arginina metil ester

LPS - Lipopolissacarídeo

LT- leucotriene

lyn- pertence a família da tirosina quinase

MAPK- proteína quinase ativada por mitogeno

MD2- proteína acopladora de LPS

mg- miligrama

MHC- antígeno de histocompatibilidade

MIF- fator de inibição de macrófago

ml- mililitro

MPO-mieloperoxidase

mRNA- RNA mensageiro

myc- proto-oncogene, fator de transcrição nuclear

MyD88- proteína citosólica ativada pelo toll

NADH – nucleotídeo de adenina desoxirribose

NADPH – nucleotídeo de adenina fosfato desoxirribose

NF-κB- fator de transcrição nuclear -κB

NKC- célula natural killer

NO- óxido nítrico

NOS- enzima óxido nítrico sintetase

O₂⁻ - superóxido

ONOO⁻ - peroxinitrito

p50- subunidade do NF-κB

PAF- fator ativador de plaquetas

PAMP – padrão molecular de antígenos

PARP- poli(ADP ribose) polimerase

PG- prostaglandina

PGE2- prostaglandinas E2

PMN- polimorfo nuclear

PRR – receptores de reconhecimento de padrão

RNA- ácido ribonucleico

SARA- síndrome da angústia respiratória do adulto

sCD14- CD14 solúvel

SIRS- síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SNP-nitroprussiato de sódio

SOCS-supressor de sinalização de citocina

SOD-super óxido dismutase

T- linfócitos do tipo t

TBARS- produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico

TGF- β - citocina TGF

Th0 – células T não diferenciadas, não ativadas

Th1- células T com padrão de resposta pró-inflamatória

Th2- células T com padrão de resposta anti-inflamatória

Th3- células reguladores

TIRAP- proteína adaptadora contendo Toll-IL-1R

TLR- receptor do tipo toll

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TOLL- Denominação da proteína de reconhecimento de LPS

TRAF- ativador quinase TNF relacionado

TXA2- tromboxane A2

UDP-uracila difosfato

UFC = CFU- unidades formadoras de colônia

UTI- unidade de terapia intensiva

UTP- uracila trifosfato

VCAM-1- Molécula de Adesão da Célula Vascular

RESUMO

SORIANO, F. G. Sepsis: Estudos das alterações celulares, teciduais e orgânicas produzidas por modelos de sepsis experimental. Análise da participação de citocinas e expressão gênica. São Paulo, 2006. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A sepsis é causada por microorganismos tais como: bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus. As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são as responsáveis pela maioria dos casos da sepsis (36% e 35%, respectivamente). No Brasil dados do estudo BASES mostraram que sepsis é a principal geradora de custos nos setores público e privado. Os gastos com pacientes de UTI no ano de 2003 somaram R\$ 17,34 bilhões, o que representa aproximadamente entre 30 a 35% dos gastos globais com a área de saúde. O Brasil tem entre 9 a 10 mil UTIs, e 25% dos leitos destas unidades são ocupados por pacientes que desenvolveram sepsis, a mortalidade está ao redor de 50%. As estimativas nacionais são de 398.000 casos em 2003, evoluindo para choque séptico e óbito num total de 227.000 pacientes. Apresento nesta tese uma análise de parte dos estudos realizados por mim nesta área.

SUMMARY

SORIANO, F. G. Sepsis: Celular, tissue and organ alterations in na experimentla model of sepsis. Role of cytokines and gene expression. São Paulo, 2006. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Sepsis is caused by microorganism: gram-negative and Gram-positive bacteria, mycosis and virus. The Gram- positive and Gram- negative bacteria are responsible for 36% and 35% of cases, respectively. Brazilian data from study BASES shown sepsis as the main disease in costs for healthcare system. Brazil spent in 2003 as much as R\$ 17,34 billions, for ICU patients care, it is about 30 to 35% of global budget for Health Ministry. Brazil has 9 to 10,000 ICU, and 25% is used for septic patients, the mortality is 50%. The incidence of sepsis in Brazil is estimated in 398,000 cases in 2003, and 227.000 patients presented an evolution to septic shock or death. Here I will present part of my studies in sepsis field.

SEPSE:

**ESTUDOS DAS ALTERAÇÕES CELULARES,
TECIDUAIS E ORGÂNICAS PRODUZIDAS POR
MODELOS DE SEPSE EXPERIMENTAL.**

**ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS E
EXPRESSÃO GÊNICA.**

INTRODUÇÃO

Os meus estudos decorrem dos seguintes fatos: a- minha atuação como médico na área de terapia intensiva; b- meu interesse desde pesquisa básica até a aplicada à prática clínica; c- e minha tese de doutorado na linha de pesquisa envolvendo células endoteliais que são alvo importante de agressão por radicais livres e diversos fatores inflamatórios produzidos em patologias de terapia intensiva. Nesta tese apresentaremos os trabalhos realizados sobre a linha de pesquisa sepsE em modelos experimentais, descrevendo estudos que abordam as principais alterações produzidas por esta síndrome e intervenções terapêuticas experimentais. Descreveremos os estudos dividindo-os em cinco partes:

- I- Desenvolvimento de modelo experimental de endotoxemia por injeção de lipopolissacarídeo (LPS) em murinos. Caracterização das alterações clínicas e orgânicas da endotoxemia;
- II- Papel das substâncias purinérgicas na sepsE;
- III- Relevância dos receptores TOLL na endotoxemia experimental;
- IV – Papel do óxido nítrico, peroxinitrito e da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) na lesão tecidual decorrentes da hiperglicemia e da sepsE;
- V – Estudo dos efeitos de indução de tolerância ao LPS sobre as populações linfocitárias e sua expressão gênica.

Sepse: clínica e epidemiologia

Em 1992, a sepsis foi definida pela Conferência da Sociedade de Terapia Intensiva Americana como uma resposta sistêmica à infecção, manifestada pela presença de dois ou mais sintomas: a) alteração de temperatura, acima de 38°C ou abaixo de 36°C; b) aumento de frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto; c) aumento de frequência respiratória acima de 20 respirações por minuto ou PaCO₂ menor que 32 torr (mmHg) e contagem de leucócitos no sangue acima 12000/ mm³ ou menor que 4000/mm³ [1]. A sepsis representa um subgrupo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Aproximadamente 70% dos pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) desenvolvem a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ocorrer também em associação com eventos não infecciosos, como por exemplo: politraumatismo, cirurgia, pancreatite e queimaduras [1-3]. Quando o choque séptico se instala, com hipotensão arterial sistêmica de difícil controle, este estado pode progredir para falência de múltiplos órgãos e sistemas [4-7]. A SIRS evolui freqüentemente com disfunção de órgãos, e praticamente todos os pacientes em sepsis apresentam disfunção de pelo menos um órgão na evolução da doença. Aproximadamente de 10 a 25% dos pacientes críticos que necessitam admissão na UTI apresentam-se em sepsis [7, 8]. A sepsis é causada por microorganismos tais como: bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus. As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são as responsáveis pela maioria dos casos da sepsis (36% e 35%, respectivamente). A sepsis grave e o choque séptico estão associados a

taxas de mortalidade de 40 a 60% [9]. Dados dos Estados Unidos indicam que ocorrem aproximadamente 500.000 casos de sepse por ano [4]. Sepse, SIRS e choque séptico juntos representam a causa mais importante de morte em UTI de adultos, superando as doenças cardiovasculares.

No Brasil dados do estudo BASES mostraram que sepse é a principal geradora de custos nos setores público e privado [10]. Estes altos custos são devidos à necessidade de utilizar equipamentos sofisticados, medicamentos caros e exigir intenso trabalho multiprofissional de equipes como: enfermagem, fisioterapia, nutrição, farmacêutica e médica. Os gastos com pacientes de UTI no ano de 2003 somaram R\$ 17,34 bilhões, o que representa aproximadamente entre 30 a 35% dos gastos globais com a área de saúde. O Brasil tem entre 9 a 10 mil UTIs, e 25% dos leitos destas unidades são ocupados por pacientes que desenvolveram sepse, a mortalidade está ao redor de 50%. As estimativas nacionais são de 398.000 casos em 2003, evoluindo para choque séptico e óbito num total de 227.000 pacientes [10].

A mortalidade não tem se modificado nas últimas duas décadas apesar do desenvolvimento de novos antibióticos e aprimoramento de medidas de tratamento intensivo. O tratamento permanece de suporte e direcionado para o controle da infecção e correção de distúrbios hemodinâmicos [4-7]. As estratégias novas para o tratamento da sepse foram focadas em inibidores da endotoxina (anticorpos anti-endotoxina), em inibidores de citocinas (TNF) e em bloqueadores de produção de substâncias vasoativas (óxido nítrico) [11].

Apesar do considerável investimento para avaliação de novos medicamentos, a maioria desses não demonstrou qualquer benefício em diminuir a mortalidade em ensaios clínicos. Entretanto, os resultados de ensaios com proteína C ativada no tratamento dos pacientes com inflamação sistêmica e falência dos órgãos parecem promissores [12]. Os estudos da intervenção hemodinâmica precoce dirigida pela saturação venosa de oxigênio, o uso de corticóides em baixas doses e o controle glicêmico intenso tem se mostrado como possíveis terapêuticas para redução da mortalidade nesta patologia [13-17].

Fisiopatologia da sepse

A resposta sistêmica à infecção é mediada através de citocinas produzidas por macrófagos, que estimulam receptores específicos das células do sistema imunológico e de órgãos alvo. As citocinas: interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são eventos deflagrados precocemente neste processo [18-22]. Estas citocinas estimulam a liberação de outros mediadores da resposta inflamatória como produtos derivados do ácido araquidônico (PGE2, TXA2), fator ativador de plaqueta (PAF); peptídeos vasoativos: como bradicinina, angiotensina, peptídeo intestinal vasoativo; aminas como histamina e serotonina; uma variedade de produtos derivados do complemento assim como outras citocinas [9].

Uma intrincada rede de mediadores regula a produção e liberação de citocinas, a qual mantém a resposta inflamatória sob controle através de redução da produção e contrabalanço dos efeitos de citocinas pró e antiinflamatórias. Em alguns pacientes é difícil estabelecer o adequado equilíbrio e neste estágio o controle é perdido ocorrendo uma intensa reação inflamatória [5, 23, 24].

LPS e inflamação

O LPS de várias famílias microbianas gram-negativas é constituído do mesmo princípio arquitetônico: polissacarídeo ligado covalentemente com o lipídeo A (LA) (Ilustração 1). A cadeia O é característica e única para cada sorotipo bacteriano, e importante fator da virulência. O LA representa o princípio endotóxico do LPS. O LA bioativo forma micelas em meio aquoso, pela sua característica anfófila, e em condições fisiológicas de eletrólitos e pH, apresenta-se exclusivamente em estrutura cúbica ou hexagonal [25].

A literatura tem discutido se a sepse é caracterizada por curto período da “síndrome de resposta inflamatória sistêmica” e seguido por um sustentado período de imunossupressão e antiinflamação chamado “síndrome da resposta antiinflamatória compensatória” (CARS). Outros autores propõem que a SIRS prossegue pela liberação de citocinas pro-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e outras, sobreposta a CARS. A CARS é caracterizada por defeito na apresentação de antígeno, “paralisia” de macrófagos, anergia de células T, supressão de proliferação de células T, diminuição da proliferação de células

Th1 e aumento de apoptose das células B e T. Muitos dos efeitos da fase CARS são mediados pela IL-10 [26].

Ilustração 1. representação esquemática da parede celular das bactérias gram-negativas. Estão representados os constituintes: lipídeo A, lipoproteína, O-antígeno.

A resposta imunológica é realizada pela sucessão dos mecanismos inatos e adaptativos, ou seja, nas fases iniciais da infecção há um predomínio das respostas inatas e nas fases mais tardias os linfócitos passam a gerar respostas imunológicas adaptativas. A principal diferença entre estes dois tipos de respostas é que a resposta adaptativa é altamente específica e desenvolve

memória contra o germe agressor. A expansão clonal dos linfócitos em resposta a um agente infeccioso é absolutamente necessária para geração de uma resposta imunológica eficiente. O desenvolvimento de clones diferenciados em células efetoras leva de 3 a 5 dias. Os linfócitos “memorizam” a estrutura do agente agressor e passam a responder mais rápida e eficientemente no caso de haver uma reinfecção pelo mesmo patógeno. Contudo, este período de tempo para desenvolver a resposta adaptativa é bastante longo, e suficiente para que as bactérias produzam graves danos ou a morte do hospedeiro, desta forma é necessário um mecanismo de ação rápida, ou melhor, de ação imediata. Os mecanismos efetores da imunidade inata (peptídeos antimicrobianos, fagócitos e via alternativa do complemento) são ativados imediatamente após a invasão. A resposta imunológica inata utiliza sistemas de reconhecimento primitivos e inespecíficos, que permitem sua ligação a muitos produtos microbianos [27]. Estas estruturas estão referidas como “padrões moleculares associados a patógeno” (PAMP) (p.ex. LPS, peptidoglicano, ácidos lipoteicóicos, mananos, DNA das bactérias, RNA de dupla-fita e glucanos), e os receptores do sistema da imunidade inata que estão envolvidos no reconhecimento dos PAMPs são chamados receptores de reconhecimento do padrão (PRR). Estes receptores estão expressos em muitas células efetoras do sistema inato, tais como neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos, células dendríticas e células B – as células “profissionais” de apresentação de antígeno. Os LPS-PRRs reconhecem LPS, encontrado exclusivamente em bactérias gram-negativas e “alertam” o sistema

imunológico sobre a presença das bactérias [23]. Os sinais induzidos em consequência do reconhecimento pelo sistema imunológico inato, controlam a ativação da resposta imunológica adaptativa. O sistema imunológico adaptativo responde ao patógeno somente depois que este é reconhecido pelo sistema imunológico inato.

Mecanismos moleculares de ação do LPS

Duas proteínas a ligadora de LPS (LBP) e o CD14 competem com a lipoproteína de alta densidade (HDL) pela ligação do LPS, tendo consequências contrastantes para o hospedeiro. A ligação do LPS ao LBP sérico facilita a transferência de LPS para CD14, facilitando a transdução de sinal para as células inflamatórias. Por outro lado, quando LPS é transferido para lipoproteínas, o seu efeito tóxico é neutralizado e a resposta inflamatória no hospedeiro é efetivamente interrompida. Depois da associação com fatores séricos, LPS interage com receptores expressos pelas células alvo da endotoxina, tais como, granulócitos, linfócitos, células endoteliais e, em particular, monócitos/macrófagos [28].

O CD14 é uma proteína da superfície externa da membrana celular de monócitos que facilita a ativação celular induzida pelo LPS. O CD14 em conjunto com a proteína MD2 participam na apresentação de LPS para o receptor similar ao Toll tipo 4 (TLR4), ativando posteriormente os leucócitos

para a secreção de citocinas e inicia uma resposta inflamatória aguda (Ilustração 2) [28].

Ilustração 2. Vias de sinalização celular deflagradas pelo LPS.

Os receptores como TLRs induzem a expressão de CD80 ou CD86 em células apresentadoras de antígeno. A célula T recebe sinais para ativação só se o seu receptor se ligar ao PAMP/LPS (sinal de co-estimulação) e se um outro receptor de antígeno reconhecer LPS em forma de uma molécula ligada ao complexo principal de histocompatibilidade do próprio organismo (MHC) de classe II. Reconhecimento de LPS na ausência de moléculas CD80, CD40 ou CD86 resulta em permanente inativação, apoptose ou tolerância de células T. Assim, este mecanismo assegura que, normalmente, somente células T específicas para determinado patógeno sejam ativadas. Além disso, o ambiente das citocinas (IL-12) secretadas pelas células apresentadoras de antígenos determina a sub-população de células T a ser produzida a partir das células Th0. Depois da ativação, as células T auxiliares tipo 1 (Th1) (possivelmente, também tipo 3) controlam outras unidades da imunidade adaptativa e inata, tais como ativação de células T citotóxicas, células B e macrófagos [19, 20]. O evento central na cascata fisiopatológica da sepsis é uma liberação sistêmica excessiva de citocinas pro-inflamatórias, tais como, $\text{TNF}\alpha$, interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, e interferon- γ (INF γ) em resposta ao LPS (Ilustração 3). Estas citocinas ativam sistemas celulares (fagócitos e endotélio) e humoral (rotas de coagulação, ativação de complemento, e mediadores de baixo peso molecular) os quais são primariamente orientados para eliminação de bactérias invasoras, mas ocasionalmente se tornam uma inflamação generalizada auto-destrutiva com consecutiva falência de múltiplos órgãos [29, 30].

ILUSTRAÇÃO 3. INTERAÇÕES CELULARES E MOLECULARES NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A INVASÃO BACTERIANA.

**I - DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL
DE ENDOTOXEMIA POR INJEÇÃO DE LPS EM MURINOS.
CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E
ORGÂNICAS DA ENDOTOXEMIA.**

(Referente a resultados da tese “Avaliação temporal da regulação do tônus vascular e da produção de superóxido induzido por purinas em aorta isolada de ratos Wistar endotoxêmicos” do aluno Hermes Vieira Barbeiro)

I. I - ALTERAÇÕES CLÍNICAS

A administração experimental de endotoxina (LPS) em animais mimetiza o quadro de inflamação sistêmica da seps e do choque séptico [31]. O LPS induz hipofagia, perda de peso e hipolocomoção; sintomas coletivamente relacionados a prostração [32]. Estudos tem relacionado a alteração do comportamento, como por exemplo redução da ingesta alimentar, ao aumento de interleucina 1β e da ciclooxigenase 2 (COX2) [33, 34].

O sistema nervoso central detecta as citocinas e traduz estas como um sinal molecular de inflamação. Uma das manifestações habituais da ação de IL- 1β e TNF- α é a alteração do nível hipotalâmico pré-estabelecido (“set point”) para a regulação da temperatura. Face a uma ameaça representada por patógenos infecciosos os seres vivos produzem uma “mobilização” do sistema nervoso central que organiza a percepção e ação de defesa contra agressão [35].

Estabelecemos inicialmente em nosso laboratório o conhecimento do quadro clínico induzido pela endotoxemia avaliados por métodos quantitativos.

Caracterização do modelo experimental de endotoxemia

Podemos observar na figura I-I-1, que os animais que receberam LPS apresentam progressiva perda de peso em comparação aos animais que receberam salina. Os animais injetados com LPS tiveram perda de peso de $12,4 \pm 0,7g$; $13,7 \pm 0,5g$ e $19,3 \pm 1,4g$ nos períodos de 8, 16 e 24 horas pós LPS, respectivamente (Figura I-1).

Figura I-I-1. Perda de peso dos animais tratados com LPS (10mg/kg i.v.) por períodos de 8 ($12,4 \pm 0,7$ g; n=8), 16 ($13,7 \pm 0,5$ g; n=7), e 24 ($19,3 \pm 1,4$ g; n=9), horas e seus respectivos controles. * $p < 0,05$ em comparação com seu respectivo controle; # $p < 0,05$ em comparação com os demais grupos.

Além disto notamos na figura I-I-2 as alterações nos padrões do ciclo circadiano após a indução de endotoxemia na regulação da temperatura e dos padrões de comportamento relativos a ingesta alimentar, movimentação espontânea, e exercício. Os dados de movimentação são unidades arbitrárias de amplitude e a ingesta alimentar representa a frequência de eventos em que o animal entra no compartimento que contém o alimento.

O padrão mostrado nesta figura evidencia clara prostração do animal, levando a reduzida movimentação e ingesta alimentar após o LPS, a curva de temperatura se altera mantendo um plateau mais elevado em comparação a antes da injeção com LPS. É interessante notar que monitorando continuamente a temperatura, pudemos observar dois momentos de temperatura acima dos $37,8^{\circ}\text{C}$, contudo na rotina de uma UTI onde não se

mede a temperatura continuamente estes momentos podem ou não ser detectados. Desta forma ou a monitorização contínua deveria ser implementada, ou devemos avaliar a temperatura por uma média dos valores ao longo do dia.

Figura I-I-2. Alterações de amplitude e frequência nos padrões do ciclo circadiano ocasionado pela injeção de LPS (10mg/kg i.p.) sobre o padrão de movimentação espontânea (A), ingestas alimentares (B), sobre o padrão de exercício físico (C) e na temperatura corpórea (D). n=7.

A figura I-I-3 apresenta os resultados obtidos nos diferentes períodos de estudo para a movimentação, procura por alimento, exercício espontâneo e temperatura, integrando a área da figura I-I-1 para os diferentes tempos

estudados. Dessa forma torna-se mais compreensível e matematicamente avaliáveis os dados obtidos.

Figura I-I-3. Quantificações por períodos da movimentação espontânea (A), ingestão alimentar (B), do exercício físico (C) e da temperatura corpórea (D) n=8. * p < 0,05 em comparação com seu respectivo controle.

LPS e quadro clínico

Perda de peso, ciclo circadiano e mortalidade.

Prostração, a queda do estado geral, é um estado motivacional desencadeado por estímulos imunológicos através do qual um organismo reorganiza suas prioridades para enfrentar a infecção [32].

Experimentalmente, o “estado de doença” pode ser induzido em roedores pela administração de LPS [36, 37]. A endotoxina induz maior produção de interleucinas pro-inflamatórias pela ativação de monócitos e macrófagos [38]. As citocinas plasmáticas atuam no cérebro, produzindo os sintomas clássicos de uma doença infecciosa, como febre, anorexia, caquexia e hipolocomoção [32, 39].

Os parâmetros estudados: ingesta alimentar, temperatura, movimentação e exercício espontâneo revelaram o desenvolvimento do comportamento alterado precocemente perante uma infecção, comprovado pelo aumento da temperatura corpórea desde o período de 8 horas. A observação da curva de temperatura mostra que a elevação em comparação aos valores basais ocorre em 1 hora pós LPS. Por outro lado, se procuramos por temperaturas acima de 37,8 °C, observamos que isto ocorre durante o período de 24 horas em duas vezes. Este dado mostra a ineficiência de medidas de temperaturas esparsas em tempos de 4 ou 2 horas, como utilizamos nas UTIs, pois há grande chance de não detectarmos momentos “febris” desta última forma. O padrão da curva de temperatura é possivelmente mais relevante do que valores esporádicos. É notório como há mudança do

perfil da curva de temperatura ao longo do tempo após o LPS, mantendo um patamar superior ao período basal.

A análise do padrão de atividade na roda demonstra uma redução da atividade nos animais endotoxêmicos. Por outro lado, a movimentação espontânea não foi significativamente reduzida no período inicial de 8 horas. Ocorre prostração precoce, porém no período de claro o rato tem menor atividade o que dificulta diferenciar efeitos que levem a uma redução desta atividade.

A aferição quantitativa dos parâmetros estudados através de telemetria possibilita estudar alterações em animais não anestesiados e por períodos longos de tempo. Esta metodologia possibilitou tornar objetivas as avaliações qualitativas. A cronologia exata dos eventos desencadeados pela toxina passou a ser conhecida, e podemos futuramente correlacioná-la com dosagens bioquímicas, hemodinâmicas, moleculares e todas as alterações encontradas nesta patologia.

Observamos perda progressiva de peso nos animais injetados com LPS quando comparados com seus respectivos controles. A dose de LPS utilizada no estudo global, e não apenas nos 7 animais utilizados nesta parte do estudo, produziu mortalidade de 18%, evidenciando que o quadro produzido por essa dose de LPS foi grave.

O conjunto destes dados simples e rotineiros, dependentes da ação de muitos fatores, é útil como detector da ocorrência de alterações fisiopatológicas importantes.

I. II - LESÃO A ÓRGÃOS

Choque endotóxico está associado com hipotensão, diminuição da resistência vascular periférica e injúria do endotélio [40]. Uma das conseqüências da endotoxina é a excessiva produção de radicais livres derivados do oxigênio pela ativação de neutrófilos [41]. Estes fatores contribuem na instalação e manutenção do processo inflamatório.

Alterações funcionais e morfológicas das células endoteliais desempenham papel importante nos distúrbios da circulação. Clinicamente, a endotoxemia encontrada freqüentemente em várias patologias é considerada causadora de desordens na microcirculação resultando em falência de múltiplos órgãos e sistemas (MOF) e isto é característico dos estágios finais de doenças sistêmicas graves [42].

Alterações pulmonares decorrentes da endotoxemia

O pulmão é frequentemente lesado na endotoxemia, e a quantificação do dano tecidual foi avaliada pelo grau de infiltração celular, indução de COX2 e quantidade de colágeno nos diferentes períodos estudados.

Foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina (Figura I.II.4) para a quantificação da área de parênquima e o número de células presentes no interstício (Figura I.II.5),

Figura I.II.4. Coloração de HE (Hematoxilina e Eosina) em pulmões de animais controles e tratados com LPS 10 mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas. Aumento de 200x.

Figura I.II.5. Área de parênquima (A) e número de células no interstício (B). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

COX-2

Para caracterização da endotoxemia também foi realizada marcação específica com anticorpo primário para COX2 (Figura I.II.8). A média e erro padrão específico para cada grupo estão expostos na Figura I.II.9.

Figura I.II.8. Coloração específica para COX2 em pulmões de animais controles e tratados com LPS 10 mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas. Aumento de 400x.

Há dados na literatura mostrando que as prostaglandinas exercem papel importante na resposta imunológica alterando os efeitos pró-inflamatórios de quimiocinas e seus receptores que são os principais responsáveis pela migração leucocitária [43]. O estudo imunohistoquímico do tecido pulmonar revelou maior expressão de COX2 nos animais tratados com LPS. Este dado sugere possível ativação das vias inflamatórias no parênquima e endotélio. Fato este que é coincidente com o achado de aumento de infiltrado

inflamatório, possivelmente decorrente da ação quimiotática de substâncias produzidas no pulmão ou decorrente da ativação do endotélio.

Figura I.II.9. Quantificação da COX2 em animais controles e em animais tratados por 8, 16 e 24 horas após a injeção de LPS 10mg/kg i.p. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Outra interpretação plausível é que o aumento de COX2 no pulmão provém das células inflamatórias que infiltraram este órgão. É interessante que estes animais não apresentaram aumento da área intersticial, ou seja, não houve edema tecidual detectável pela histologia, isto é, em termos fisiopatológicos significa que não houve aumento da permeabilidade vascular e lesão endotelial significativa dentro do período de 24 horas, neste modelo empregado. No entanto, houve aumento do infiltrado inflamatório, assim formulamos a hipótese de que há predomínio de ação quimiotática neste período.

Colágeno tecidual

Analizamos o remodelamento do parênquima pulmonar através da quantificação do colágeno total existente nos pulmões dos animais controle e

dos animais tratados com LPS 10mg/kg i.v. pela coloração de Picrossírius (Figura I.II.6 e Figura I.II.7).

Figura I.II.6 – Coloração de Picrossírius em pulmões de animais controles e tratados com LPS 10 mg/kg i.p. por 8, 16 ou 24 horas. Aumento de 400x.

Figura I.II.7. Quantificação do colágeno total em pulmões de animais controles e de animais tratados por 8, 16 e 24 horas após LPS 10mg/kg i.p.

* $p < 0,05$ em comparação com os demais grupos.

A análise da quantidade de colágeno mostrou aumento em 24 horas após LPS e este dado revela-se interessante, pois o fenômeno de fibrose e remodelamento pulmonar é precoce no modelo estudado [44].

Em conclusão há um precoce infiltrado do parênquima pulmonar por células inflamatórias, e aumento do colágeno. Estes dados se correlacionam com os achados em pacientes de disfunção pulmonar e evolução para fibrose, contudo o nosso estudo mostra que o fenômeno de deposição aumentada de colágeno é precoce (primeiro dia) na evolução da doença.

II - PAPEL DAS SUBSTÂNCIAS PURINÉRGICAS NA SEPS

Estudos de lesão endotelial, alteração de reatividade vascular e lesão de múltiplos órgãos.

(Referente a resultados: 1-da tese “Avaliação temporal da regulação do tônus vascular e da produção de superóxido induzido por purinas em aorta isolada de ratos Wistar endotoxêmicos” do aluno Hermes Vieira Barbeiro; 2- Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture. American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine, v. 164, n. 7, p. 1213-1220, 2001; 3- Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. Critical Care Medicine, EUA, v. 29, n. 4, p. 703-708, 2001.)

II. I - Ação do ATP e ADP sobre a regulação do tônus vascular, produção de radicais livres e atividade do óxido nítrico síntase em animais endotoxêmicos.

Nos mamíferos, o endotélio está presente em todos os tipos de vasos sanguíneos e, portanto em todos os órgãos. Em um homem de 70 kg, constitui uma área de 1000 m² com 10¹² células e 100 gramas aproximadamente [45].

As células endoteliais têm papel multifuncional, elas regulam respostas imunológicas, controlam a coagulação sangüínea, servem como interface entre sangue e tecido ajustando a permeabilidade dos vasos, contribuem na angiogênese e recuperação vascular e na modulação do tônus vascular. Estas diversas funções conferem às células endoteliais funções indispensáveis na homeostase corpórea tanto em condição normal quanto em algumas condições patológicas [46, 47].

Furchgott e Zawadski descobriram que o endotélio libera um potente vasodilatador em resposta ao agonista muscarínico [48, 49], esta substância foi inicialmente denominada de EDRF (Fator Relaxante Derivado do Endotélio). Sete anos depois, os grupos de Ignarro, Palmer e Murad mostraram, em estudos independentes, que o EDRF é o Óxido Nítrico (NO) [50-52]. Demonstrou-se também que esta molécula, o NO, é sintetizada pelas células endoteliais a partir da L-arginina.

O endotélio regula o tônus vascular através da síntese e liberação de substâncias vasoativas que promovem a vasoconstrição (endotelina e Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio - EDHF) ou a vasodilatação (óxido nítrico). A bradicinina e angiotensina II, também têm ação de modulação do tônus. A produção e liberação de NO é efetuada de forma quase que instantânea, conferindo ao NO a propriedade de regular o tônus dos vasos às necessidades do órgão [53].

Nos processos inflamatórios a ativação do endotélio leva a migração de leucócitos para o espaço extravascular guiando estas células através da monocamada endotelial. Na presença de endotoxina, o endotélio é ativado para expressar fatores mediadores da migração de leucócitos: o ICAM (Molécula de Adesão Inter-celular), VCAM-1 (Molécula de Adesão da Célula Vascular) e E-selectina [53].

A disfunção endotelial está associada com redução ou a perda da capacidade de liberar NO bioativo em resposta ao mediador acetilcolina; seja por reduzir a formação ou por acelerar a degradação do NO. A degradação do NO também se dá pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) incluindo o O_2^- , que é um dos maiores responsáveis pela disfunção endotelial [54]. Lesões celulares mediadas por ERO estão associadas com a patogênese de várias doenças como infarto do miocárdio, inflamação, hipertrofia cardíaca, aterosclerose e disfunção endotelial no diabetes [55, 56]. Em condições normais os tecidos vasculares geram espécies reativas de oxigênio (ERO) pela atividade de uma oxidase a qual catalisa a redução do oxigênio molecular

para O_2^- , usando NADH ou NADPH como doador de elétrons [57]. Contudo, a função fisiológica da NADPH oxidase ainda não está determinada [58].

Em relação a sepse a literatura relata como causa de injúria a órgãos e perda do tônus vascular o aumento de NO, em consequência de uma maior produção pela enzima iNOS. O NO em concentrações elevadas produz dano celular pela sua propriedade de espécie reativa e pela interação com o superóxido formando $ONOO^-$, um potente agente oxidante [59]. O $ONOO^-$ é um oxidante que estimula o processo inflamatório pela ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B [56, 60, 61].

Classificação dos receptores purinérgicos

O ATP é conhecido classicamente como fornecedor de energia para muitas reações enzimáticas nos seres vivos. Entretanto, esta substância também pode ser liberada na corrente sanguínea por células endoteliais, plaquetas e neurônios purinérgicos, produzindo efeitos de vasodilatação e agregação plaquetária [62-69], esses efeitos biológicos do ATP são decorrentes da ativação de receptores específicos para as substâncias purinérgicas [70].

Duas famílias de receptores purinérgicos são conhecidas – P1 e P2 - a adenosina e a inosina se ligam a receptores do tipo P1 (todos acoplados a proteína G), enquanto que ATP, ADP, UTP e UDP se ligam aos receptores do tipo P2 [70]. Os receptores P1 foram subdivididos em quatro subgrupos (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3); os receptores do tipo P2 foram subdivididos em P2X e P2Y,

baseando-se em sua forma estrutural, evidências bioquímicas e ações farmacológicas [71]. Os receptores P2Y compõem a superfamília de receptores acoplados a proteína G; deste grupo foram descritos os seguintes subtipos de P2Y: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁. Os receptores P2X produzem suas ações ligando-se a canais iônicos, os descritos até o momento são P2X₁₋₇ [72]. O ATP ativa todos os tipos de receptores P2Y, contudo, outras substâncias purinérgicas como o ADP, UTP, UDP e GTP não apresentam o mesmo espectro de atividade. Os receptores P2Y são largamente distribuídos e tem sido reportados no coração, tecido vascular, tecido conectivo e tecido neural [70]. Os estudos de De Mey e colaboradores [73] mostraram que o ATP induz vasodilatação por ativação de receptores P2Y endoteliais; este efeito é produzido tanto pelo ATP liberado de terminações neuronais quanto pela administração intravenosa. O efeito de vasodilatação ao ATP também foi descrito em veia porta e artérias pulmonares [74, 75]. Receptores P2Y são significativamente mais sensíveis ao ATP do que os receptores do tipo P2X [72]. Purinorreceptores do tipo P2X localizados no músculo liso desencadeiam vasoconstrição ao serem estimulados pelo ATP [71, 76].

Receptores P2 no vaso sanguíneo

Os principais subtipos de receptores purinérgicos P2 presentes no endotélio são P2Y₁ e P2Y₂, mas RNA mensageiro para P2Y₄ e P2Y₇ já foram identificados no endotélio [77]. Receptores do tipo P2X são expressos pela células endoteliais em quantidades muito pequenas, portanto sua expressão e

papel fisiológico precisam ser melhor avaliados [78]. Evidências funcionais sugerem que as células endoteliais expressam receptores P2X₇ [79], enquanto estudos moleculares revelam a expressão de receptores P2X₄ [80]. Há vários relatos documentando a expressão, pela célula endotelial, de outros membros da família de receptores P2 (P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₅ e P2X₆) [78]. Células da musculatura lisa vascular expressam P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X₇, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆ [81] e não há relato sobre a expressão de P2Y₁₁. Especialmente em condições patológicas o resultado final da estimulação vascular de nucleotídeos de adenosina depende da interação das respostas individuais dos receptores P2Y e P2X em todos os elementos da parede vascular [78].

Nossos estudos na área de purinérgicos e endotélio iniciaram-se com a demonstração de que enzimas da membrana plasmática da célula endotelial metabolizam o ATP. São as ectoATPase ou difosfohidrolases, que têm seu sítio ativo na face extracelular da membrana plasmática [82]. Estas enzimas quebram o ATP para ADP e AMP, e pela ação conjunta da 5'nucleotidase o AMP é transformada em adenosina, substância que pode ser transportada para o interior da célula. Demonstramos que concentrações elevadas de potássio, passíveis de serem encontradas em situações de choque, isquemia e reperfusão, inibem a atividade desta enzima [82]. Os dados mostram um papel fisiológico das substâncias purinérgicas e suas concentrações podem ser modificadas durante o choque séptico, perante estes fatos passamos a estudar o papel do ATP e ADP na regulação do tônus vascular, da produção de

radicais livres e do NO na situação de sepse induzida por administração intraperitoneal de LPS.

Superóxido

Nosso estudo mostrou que o LPS induziu aumento na produção vascular de O_2^- , com a maior quantidade sendo encontrada no período de 16 horas (períodos estudados: 8, 16 e 24 horas após injeção de LPS 10mg/kg i.p.) (Figura II. I. 1).

Figura II. I.1. Quantificação de Superóxido em aorta isolada em animais controles e injetados com LPS 10mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas. Modulação pelo ATP e ADP. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo injetado por 16 horas.

O O_2^- desempenha funções de sinalização de fenômenos fisiológicos, como ativação da célula endotelial e regulação da expressão de moléculas de adesão da célula endotelial (ECAM). Contudo, níveis elevados de O_2^- induzem dano celular e tecidual do próprio organismo. O endotélio é uma das principais fontes de O_2^- , e a cadeia respiratória mitocondrial durante agressões celulares representa uma importante via de produção de O_2^- [83].

A literatura relata a alteração da reatividade vascular decorrente da ação de espécies reativas de oxigênio, em processos de inflamação e sepse [84, 85]. A concomitância de picos de produção de O_2^- e de NO em 16 horas cria o cenário propício à produção de peroxinitrito intravascular (figura II. I.2).

Figura II. I.2. Quantificação de nitrato em aorta isolada em animais controles e injetados com LPS 10mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

O peroxinitrito tem sido mostrado lesivo às células por produzir peroxidação lipídica e nitrosilação de proteínas o que altera a função da membrana plasmática celular e a ação de diversas enzimas. A oxidação dos componentes do material nucléico pelo peroxinitrito produz a quebra de uma fita de DNA. A enzima nuclear poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) através de sua conformação espacial em forma de “dedo contendo zinco” reconhece esta quebra do DNA, sendo então ativada e iniciado o processo de ribosilação das proteínas histonas que se encontram ao redor do ponto de quebra de DNA. [86].

Análise da reatividade vascular na endotoxemia - Participação de substâncias purinérgicas

A disfunção endotelial na sepse apresenta-se com perda da capacidade de relaxamento vascular a estímulos dependentes da ação do endotélio e redução de resposta vasoconstrictora a fenilefrina e noradrenalina [87-92].

Estudamos a ação das substâncias purinérgicas sobre a reatividade vascular de animais endotoxêmicos. As curvas dose resposta ao ATP e ADP foram realizadas em 8, 16 e 24 horas após a injeção de LPS. No período de 16 horas observamos diferença de resposta máxima para o ATP e de EC50 para o ADP. O relaxamento mostrou-se dependente do endotélio para a ação das substâncias, ATP e ADP, pois o LNAME bloqueou a resposta vascular de ambos. A inibição da cicloxigenase aumentou a sensibilidade (EC50 menor) a ATP e ADP nos animais controles. A endotoxemia mudou esse padrão frente à

inibição da cicloxigenase na resposta a ADP. O fato das substâncias purinérgicas produzirem maior relaxamento nos animais endotoxêmicos é relevante, e se opõem ao que ocorre com outros mediadores endotélio dependente.

Figura II. I.3. Reatividade vascular a noradrenalina (**A**), Cloreto de Potássio (**B**) e Acetilcolina (**C**) em aorta isolada de animais controles (**A**) e de animais injetados com LPS 10mg/kg/16h i.p. *p < 0,05 em comparação com o grupo controle + Suramin.

Figura II. I.4. Reatividade vascular ao ATP, ADP e Adenosina em aorta isolada de animais controles (A)

e de animais injetados com LPS 10mg/kg/16h i.p. (B). *p < 0,05 em comparação com o grupo controle.

Figura II. I.5. Reatividade vascular ao ATP e ao ADP em aorta isolada em animais controles e injetados

com LPS 10mg/kg/16h i.p. na presença de Indometacina e de LNAME. *p < 0,05 em comparação com a resposta máxima do grupo controle; #p < 0,05 em comparação com a EC50 do grupo controle.

No estudo sobre a produção de O_2^- encontramos significativa ação do ATP no período de 16 horas em reduzir a produção de O_2^- . Este dado por si explica a diferença de resposta vasodilatadora dos vasos de animais endotoxêmicos aos purinérgicos durante a seps. O O_2^- é uma substância que reage com o NO seqüestrando-o e, portanto reduzindo sua biodisponibilidade, o produto desta reação é o peroxinitrito. A seguir investigamos a via produtora de O_2^- modulada pelos purinérgicos no animal endotoxêmico. Novamente, utilizando-se das ferramentas inibidoras da COX e da NOS verificamos a ação do ATP/ADP na modulação de O_2^- .

Os nossos resultados mostram que na presença de indometacina o ATP mantém a capacidade de reduzir a produção de O_2^- . Sendo pouco provável que esta via seja a causadora do melhor relaxamento vascular observado no animal endotoxêmico.

Na presença de LNAME houve redução da produção de O_2^- evidenciando que a NOS dos vasos destes animais está com sua função alterada (figura II. I.6). Este dado é coerente com achados da literatura que mostram que perante o estresse oxidativo, a NOS ou cofatores seriam oxidados, e a produção de NO seria desviada para produzir superóxido. Desta forma ficou claro que uma das fontes principais de superóxido vascular nestes animais é a NOS. A redução da produção de superóxido na presença de LNAME apresentou níveis semelhantes aos obtidos pelo ATP, e é interessante observar que a posterior adição de ATP ou ADP na presença de LNAME não produziu redução adicional na produção de O_2^- . Os purinérgicos não tendo

produzido redução adicional de O_2^- elimina a possibilidade de ação “seqüestradora” direta pelo ATP/ADP.

Figura II. I.6. Quantificação de superóxido em aorta isolada de animais injetados com LPS 10mg/kg/16 horas i.p. tratadas com Indometacina (B, D), ou LNAME (A, C) seguido de ATP (A, B) ou ADP (C, D). *p < 0,05 em comparação com o grupo LPS

Estas observações confirmam a existência de desacoplamento da NOS, produzindo superóxido ao invés de óxido nítrico. A ação do ATP parece levar direta ou indiretamente a NOS a produzir óxido nítrico, o que pode ser chamado de reacoplamento da função da NOS pelo ATP.

	ATP		ADP	
	Máxima Relaxamento	EC50 (10 ⁻⁸ M)	Máxima Relaxamento	EC50 (10 ⁻⁸ M)
Controle 8h	102,82 ± 2,19	436,52 275,42 672,98	74,90 ± 5,25	346,74 141,25 851,14
LPS 8h	101,28 ± 2,79	338,84 211,35 553,35	71,61 ± 5,02	281,84 69,18 1148,15
Controle 16h	100,15 ± 0,85	—	62,15 ± 4,08	380,19 239,88 602,56
LPS 16h	106,72 ± 2,29 *	—	71,93 ± 5,40	93,32 69,18 128,82 *
Controle 24h	104,36 ± 1,36	309,03 201,37 479,73	77,59 ± 6,51	269,15 91,20 812,83
LPS 24h	97,92 ± 3,59	186,21 90,99 382,82	75,33 ± 3,94	91,20 34,67 239,88

Tabela II.1. Resposta Máxima e EC50 obtidas das Curvas Dose Resposta ao ATP e ADP em aortas isoladas de ratos controles e injetados com LPS 10mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas. *p < 0,05 em comparação com o grupo controle

II. II - A ação da inosina como antiinflamatória na redução de dano vascular e tecidual no choque endotoxêmico.

As purinas são substâncias endógenas reconhecidas por exercerem importante ação sobre o sistema imunológico. A adenosina é o nucleosídeo melhor caracterizado entre as purinas, sendo que tanto a adenosina extracelular como a intracelular tem mostrado afetar diversos aspectos do sistema imunológico [93-95]. Seus efeitos são parcialmente dependentes da inibição de processos inflamatórios que podem produzir danos, como citocinas pro-inflamatórias e radicais livres [96].

Inosina é uma purina endógena, formada pela ação da adenosina deaminase sobre a adenosina [97]. Em tecidos isquêmicos, inosina pode atingir concentrações elevadas, ao redor de 1-3 mM [98]. Inosina inibe a produção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas *in vitro* e *in vivo*, aumentando a produção da citocina antiinflamatória IL-10 [99].

No presente estudo investigamos se a inosina pode reduzir: a perda da reatividade vascular, da função intestinal, o infiltrado neutrofílico e a produção de radicais de oxigênio nos órgãos, eventos pivôs no desenvolvimento da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas.

Protocolos de Tratamento empregados neste estudo

Os camundongos foram divididos em 5 grupos experimentais: controle, inosina controle, LPS, inosina antes (INO-pre) e inosina após (INO-pós).

- I. Controle – Animais receberam somente salina fisiológica.
- II. Inosina controle – Animais foram tratados com inosina e não receberam LPS.
- III. LPS – Os camundongos neste grupo receberam LPS i.p. e salina.
- IV. INO-pre – Tratamento com inosina (100 mg/kg) 30 minutos antes da injeção de LPS.
- V. INO-pos – Tratamento com inosina (100 mg/kg) 60 minutos após a injeção de LPS.

Efeito da inosina na permeabilidade intestinal

Estudamos se os tratamentos pré e pós com inosina podem recuperar a permeabilidade intestinal alterada pelo LPS. A passagem do dextran fluorescente 4000 daltons (FD4) através da parede intestinal nos animais controle e inosina controle foi baixa, o clearance calculado foi de 16.4 ± 2.4 e 19.7 ± 1.4 nl/min/cm², respectivamente (Figura II. II.1). Animais tratados com LPS apresentaram permeabilidade intestinal aumentada, o clearance foi de 31.9 ± 2.8 nl/min/cm². O tratamento com inosina produziu significativa recuperação da permeabilidade intestinal, o clearance foi de 19.4 ± 3.0 e 24.3 ± 2.6 nl/min/cm², INO-pre e INO-pós respectivamente (Figura II. II.1).

Figura II. II.1

Permeabilidade intestinal a dextran com isotiocianato de fluoresceína (FD4) em incubação ex vivo de tubos digestivos invertidos. Após 16 horas da injeção de LPS um segmento do íleo foi retirado para a realização do clearance mucoso-seroso de FD4. Média $\pm$ e.p.m * $p < 0.05$: melhora significativa de inosina vs. LPS.

Efeito da inosina sobre a reatividade vascular

Os anéis de aorta de animais que receberam LPS apresentaram significativa redução de resposta a fenilefrina (0.792 ± 0.109 g), comparado aos controles. Os animais pré-tratados com inosina (INO-pre) mostraram melhora da contratilidade (1.162 ± 0.079 g) (Figura II. II.2). Entretanto a administração de inosina 60 minutos após o LPS não mostrou proteção ao dano vascular induzido pela endotoxina (dados não apresentados).

Figura II. II.2. Experimentos com anéis vasculares. Aorta torácica foi retirada 8 horas após a injeção de LPS para as medidas de contração (A) a fenilefrina ou relaxamento (C) a acetilcolina. Em B e D os valores são porcentagens dos efeitos máximos correspondentes. Média $\pm$ e.p.m. * $p < 0.05$: melhora significativa pela inosina vs. LPS.

A função endotelial foi analisada pela resposta de relaxamento a acetilcolina, hormônio liberador de óxido nítrico, efeito dependente de um endotélio íntegro. Os animais submetidos a LPS apresentaram disfunção endotelial com uma resposta de relaxamento reduzida ($30,9 \pm 10,1 \%$) em relação aos controles, e a inosina utilizada como pre-tratamento melhorou a função endotelial ($55,0 \pm 5,6 \%$; Figura II. II.2). Os dados foram plotados como porcentagem da tensão máxima desenvolvida ou do relaxamento para determinar a sensibilidade dos anéis de aorta a fenilefrina ou acetilcolina. As curvas de porcentagem da tensão máxima e do relaxamento foram praticamente idênticas para os grupos LPS, INO-pós, controle e inosina controle (Figura II. II.2B, D).

A inosina reduziu o processo inflamatório nos órgãos

Mieloperoxidase tecidual. A atividade de MPO nos tecidos estudados é apresentada na figura II. II.3. No pulmão houve aumento do MPO nos animais tratados com LPS, e ambos os tratamentos com inosina, pre- e pós-LPS, protegeram contra as alterações inflamatórias. Este efeito da inosina também foi observado no intestino, a atividade de MPO foi reduzida pelo tratamento com inosina, em ambos os regimes de tratamento pré- e pós-LPS (respectivamente os valores de MPO foram 5.7 ± 1.1 , 3.5 ± 0.6 e 3.8 ± 0.7 mU/mg para LPS, INO-pre e INO-pós (Figura II. II.3A). No fígado não houve elevação dos conteúdos de MPO em resposta ao LPS, e não houve significativa diferença entre os grupos estudados (Figura II. II.3C).

Figura II. II.3. A atividade da mieloperoxidase (MPO) no intestino (A), pulmão (B) e fígado (C) obtido de camundongos após a injeção de LPS. Os tecidos foram removidos após 8 horas. Média $\pm$ e.p.m. * $p < 0.05$: significante melhora pela inosina vs. LPS.

Os níveis teciduais de produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). No intestino e pulmão ocorreu significativa elevação dos conteúdos de TBARS em resposta ao LPS (intestino 1.45 ± 0.09 nmol/mg proteína e pulmão 14.41 ± 1.36 nmol/mg proteína). As duas formas de tratamento com inosina (intestino 1.13 ± 0.07 nmol/mg proteína e pulmão 3.66 ± 0.32 nmol/mg proteína) e inosina pós-tratamento (intestino 0.88 ± 0.21 nmol/mg proteína e pulmão 4.79 ± 0.46 nmol/mg proteína), reduziram os níveis de TBARS tecidual,

conforme mostra a Figura II. II.4. No fígado não houve aumento significativo de TBARS com a injeção de LPS, e inosina não teve efeitos significantes (Fig II. II.4C).

Figura II. II.4. As concentrações de produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) medidos no intestino (A), pulmão (B) e fígado (C) obtidos de camundongos após injeção de LPS. Os tecidos foram removidos após 8 horas. Média $\pm$ e.p.m. * $p < 0.05$ vs LPS: significativa melhora foi obtida pela inosina vs. LPS.

A inosina tem sido considerada um metabólito inativo das purinas na maioria dos sistemas biológicos. Contudo evidências recentes [99], assim como de outros grupos de investigadores indicam que inosina extracelular desenvolve efeitos celulares protetores importantes. Em adição à modulação

da produção de citocinas e quimiocinas pro- e anti-inflamatórias [99], esta substância previne a morte celular glial decorrente de deprivação de glicose [100], reduz a liberação de enzimas intracelulares de linfócitos submetidos a hipóxia, melhora a função renal durante a isquemia, e bloqueia os efeitos danosos da isquemia hepática total [99]. A administração de inosina tem mostrado melhorar a função cardíaca durante a falência ventricular esquerda [101, 102] e reduzir o tamanho do infarto durante oclusão coronariana [102, 103], estas ações tem sido consideradas até o momento decorrentes puramente de ação vasodilatadora.

No presente estudo, mostramos evidências sobre a capacidade da inosina em exercer potentes efeitos antichoque e protetivos a danos de órgãos *in vivo*. Parte destas ações é relacionada à habilidade da inosina em reduzir o infiltrado e acúmulo de células PMN e a peroxidação lipídica em pulmão e intestino. Intestino e pulmão são órgãos pivôs na disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. Diversos estudos têm realçado o papel central do intestino na fisiopatologia do choque de várias etiologias. O intestino é particularmente propenso a desenvolver lesões decorrentes de isquemia e reperfusão, devido à formação de “shunt” no sistema de contracorrente do fluxo sanguíneo nos vilos intestinais [104], assim como também pela abundância na mucosa intestinal do sistema enzimático xantina desidrogenase / xantina oxidase [105]. Em concordância com estes conceitos, nosso estudo mostrou que os animais endotoxêmicos desenvolveram significativa falência da barreira mucosa, evidenciado pelo marcado aumento da permeabilidade intestinal a FD4 (Figura

II. II.1). Nossos resultados demonstram que a inosina reduziu a resposta inflamatória no intestino e preservou a função de barreira intestinal. Estudos recentes têm demonstrado que o conteúdo intestinal de ATP é correlacionado à severidade da falência na barreira da mucosa intestinal [100]. Vias de consumo fútil do ATP são ativadas por espécies reativas de oxigênio, como por exemplo a via da poli(ADP-ribose) sintetase [106-108]. A redução na formação de produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (utilizado como índice de peroxidação lipídica, e produção de oxidantes reativos) pela inosina indicam que o sítio de ação da inosina é proximal a geração de radicais livres e do mecanismo de consumo de energia mencionado acima.

Nós também analisamos indicadores de falência vascular no modelo de choque endotóxico. A reatividade vascular foi recuperada pelo tratamento com inosina, fato caracterizado por desenvolvimento de maior tensão a fenilefrina *in vitro* pela aorta torácica (Figura II. II.2). A função endotelial também se mostrou recuperada pelo tratamento com inosina, com melhor resposta de relaxamento dependente de endotélio acionada pela acetilcolina. A reatividade vascular normal é fator crucial na manutenção adequada da regulação da perfusão tecidual, o bloqueio desta função está associado a disfunção de órgãos [108-111]. A disfunção endotelial é iniciada, em parte pela aderência de leucócitos aos vasos sangüíneos [108]. No choque hemorrágico, uma disfunção precoce da microcirculação tem sido demonstrada contribuir com seqüelas tardias da isquemia intestinal e pode comprometer a resposta microvascular a subseqüentes agressões sistêmicas [111]. Portanto, nosso modelo de

endotoxemia pode apresentar uma disfunção endotelial precoce seguida de acúmulo leucocitário e eventual aumento na permeabilidade intestinal. Nesta seqüência de eventos, o dano intestinal desencadeia disfunção de órgãos adicional e subseqüentemente posterior. A disfunção cardiovascular é, pelo menos em parte, dependente da produção de citocinas pro-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa: sua neutralização pode proteger parcialmente contra o desenvolvimento de hiporeatividade vascular [112]. Inosina tem capacidade de suprimir a produção de citocinas pro-inflamatórias [99], isto levanta a possibilidade que parte de seu efeito protetor decorra de reduzir as concentrações de citocinas pro-inflamatórias.

Foi demonstrado previamente que o efeito supressor da inosina sobre a produção de citocinas *in vitro* é mantido mesmo quando administrada posteriormente ao estímulo inflamatório (e.g. LPS). Foi demonstrado que o modo de ação da inosina não é relacionado a ativação de proteína quinases ativadas por mitógeno p38 e p42/p44, a fosforilação da porção quinase terminal da c-Jun, da degradação do fator kappaB, e elevação do cAMP intracelular, e esta ação é pós-transcricional ou pré-translacional [99]. Este modo tardio de ação nos encorajou a realizarmos a comparação dos tratamentos pré- e pós-LPS nos experimentos deste trabalho. Em concordância com os estudos *in vitro*, os resultados *in vivo* confirmaram que mesmo no esquema de pós-tratamento a inosina mantém alguma ação protetora. Apesar do modelo experimental empregado não poder ser comparado diretamente à situação

clínica, os achados nos encorajam, e podem indicar uma janela de oportunidade significativa para terapia do choque com inosina.

Inosina tem, na verdade, sido usada esporadicamente na prática clínica para várias formas de doenças cardiovasculares incluindo eventos isquêmicos [98]. As doses toleráveis de inosina são altas, da ordem de 5-6 g/dia em humanos (a qual é comparável à dose usada em nosso estudo). Baseado em nossos dados, e associado ao excelente perfil de segurança da inosina, a possibilidade de testes clínicos em pacientes com choque circulatório pode ser factível em curto prazo de tempo.

Diversas drogas utilizadas no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias, incluindo inibidor da adenosina quinase, metotrexate, sulfasalazina, ou ácido acetil salicílico tem sido propostos exercerem seus efeitos benéficos pela liberação de adenosina [99]. Adenosina é prontamente degradada a inosina no espaço extracelular, assim é possível que seu metabólito está envolvido nos efeitos antiinflamatórios destes agentes liberadores de adenosina.

Em resumo, nosso estudo demonstrou que a inosina reduz uma variedade de fatores da disfunção de múltiplos órgãos associados ao LPS, como demonstrado no pulmão, intestino, endotélio e músculo liso vascular. Porção significativa dos efeitos protetores da inosina é mantida no pós-tratamento.

II. III - Efeito da inosina em modelo experimental de sepse polimicrobiana

Modelo de Ligadura Cecal e Punção

O modelo de endotoxemia, induzido por LPS, reproduz a inflamação da sepse, contudo a redução da resposta inflamatória em uma situação que apresente bactérias vivas se multiplicando continuamente em um hospedeiro, pode não se mostrar benéfica. Deste modo realizamos estudo experimental em modelo de ligadura cecal e punção, onde se tem um fundo de saco contendo bactérias ocluído pela ligadura, como um abscesso que pela punção o permeabiliza para uma liberação gradual e contínua de bactérias para o peritônio do animal. Novamente realizamos tratamento com inosina e verificamos aspectos inflamatórios e bacterianos.

Grupos estudados

Os animais foram divididos para dois grupos de tratamento:

- I- Tratado com inosina dose de 100 mg/kg i.p.,
- II- Veículo (salina isotônica, 0,5 ml).

Os tratamentos foram realizados 1 hora antes da ligadura cecal; outra dose foi repetida após 6 horas. No estudo de sobrevida doses de inosina foram repetidas a cada 12 horas.

Citocinas plasmáticas e nitrato estão representados na figura II. III.1. Conforme esperado, a CLP induziu níveis elevados de todas as citocinas medidas em comparação com o controle.

Figura II. III.1. Níveis plasmáticos de TNF- μ , IL-6, IL-10, e nitrato. Camundongos sépticos pela CLP foram tratados 1 h antes e 6 horas após a cirurgia com inosina (100mg/kg, intraperitoneal; n=10) ou veículo (salina isotônica, 0,5 ml, intraperitoneal). Citocinas plasmáticas e nitrato foram medidas após 12 horas de sepse. Camundongos tratados com inosina tiveram significante redução dos níveis circulantes de todas as citocinas medidas; no nível de NO não houve diferença de produção. Os valores representam médias e EPM. *p < 0,05, versus controle; #p _ 0,05,CLP mais inosina versus CLP.

Tanto para as citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-6 e a citocina antiinflamatória IL-10, o tratamento com inosina induziu uma significativa redução dos níveis plasmáticos (TNF- α de 1.727 ± 240 para 784 ± 112 pg /ml; IL-6 de 278 ± 23 para 198 ± 30 ng/ml; IL-10 de $5,3 \pm 1,1$ para $2,3 \pm 0,4$ ng/ml). Por outro lado, as concentrações plasmáticas de nitrito entre salina e inosina foram semelhantes e não significantes (56 ± 11 e 64 ± 6 μ M, respectivamente), indicando que neste modelo a inosina não efetua sua ação regulando a produção de NO.

Culturas bacterianas quantitativas demonstraram que os animais submetidos a CLP tinham culturas de sangue e tecidos positivas após 24 horas, sem, contudo apresentarem significância estatística entre os grupos. Nos camundongos tratados com veículo ou inosina, as contagens das culturas foram, respectivamente, $(6,21 \pm 2,95) \cdot 10^{-8}$ versus $(8,46 \pm 5,54) \cdot 10^{-8}$ UFC /100 mg de tecido (fígado, $p = 0,73$, teste t), $(3,03 \pm 1,69) \cdot 10^{-8}$ versus $(1,97 \pm 0,75) \cdot 10^{-8}$ CFU/100 mg de tecido (baço, $p = 0,58$), e $(1,38 \pm 1,24) \cdot 10^{-6}$ versus $(0,39 \pm 0,19) \cdot 10^{-6}$ CFUs/ml (sangue, $p = 0,46$).

Os parâmetros bioquímicos relacionados com a injúria tecidual revelaram que o tratamento com inosina atenuou o dano decorrente da CLP no fígado, rim e pâncreas. Concentrações plasmáticas de ALT e fosfatase alcalina foram reduzidos pela inosina de $382,5 \pm 64,6$ UI/l (CLP) para $127,5 \pm 21,5$ UI/l (CLP mais inosina), e de $104,6 \pm 15,9$ UI/l (CLP) para $34,9 \pm 5,3$ UI/l (CLP mais inosina; $p < 0,05$ para ambas as variáveis). Em relação à função renal o tratamento com inosina reduziu as concentrações de nitrogênio sanguíneo

uréico de $69,4 \pm 2,4$ para $23,1 \pm 0,8$ mg/dl ($p < 0,05$) e os de creatinina de $1,12 \pm 0,05$ para $0,38 \pm 0,02$ mg/dl ($p < 0,05$). Em adição, os níveis de amilase sérica que se encontravam elevados pela CLP (1.514 ± 146 UI/l) foram significativamente corrigidos com o tratamento pela inosina (504 ± 49 UI/l, $p < 0,05$).

Alterações de órgãos foram posteriormente investigadas pela quantificação de MPO e TBARS. Em relação ao MPO, não notamos significativo aumento no intestino ou fígado após a CLP comparado ao controle, e a inosina também não produziu nenhum efeito. Em contraste, CLP induziu significativo aumento de MPO no pulmão, efeito que foi reduzido pelo tratamento com inosina (controle $17,8 \pm 2,7$ um/mg de proteína; CLP $58,1 \pm 8,6$ um/mg de proteína; CLP mais inosina $32,7 \pm 5,1$ um/mg de proteína, $p < 0,05$ versus CLP). Entretanto, inosina não foi eficiente em reduzir a elevação pela CLP de TBARS nos pulmões. Os valores respectivos de TBARS nos controles, CLP, e CLP mais inosina foram $4,2 \pm 0,7$ nmol/mg de proteína, $6,2 \pm 0,5$ nmol/mg de proteína ($p < 0,05$ versus controle), e $6,3 \pm 0,3$ nmol/mg de proteína ($p < 0,05$ versus controle, $p = \text{NS}$ versus CLP). Inosina foi eficaz em atenuar a formação de TBARS no intestino (CLP $2,91 \pm 0,16$ nmol/mg de proteína; CLP mais inosina $2,13 \pm 0,11$ nmol/mg de proteína, $p < 0,05$) e no intestino (CLP $9,57 \pm 0,84$ nmol/mg de proteína; CLP mais inosina $5,37 \pm 0,44$ nmol/mg de proteína, $p < 0,05$). Os níveis hepáticos de NAD^+ e NADH são apresentados na Tabela II.III.1.

A administração de inosina relacionou-se a manutenção do conteúdo intracelular de NAD^+ . A relação de NAD^+/NADH foi superior no grupo de animais tratados com inosina durante a CLP. Para avaliar o potencial papel da inosina sobre a expressão de quimiocinas durante a CLP, as concentrações de MIP-1 α e MIP-2 foram determinadas em homogenatos de pulmão e fígado. Conforme demonstrado na figura II. III.2, aumento massivo destas duas quimiocinas ocorreu nos camundongos desafiados com CLP, tanto em pulmão (Figura II. III.2A) quanto fígado (Figura II. III.2B), um efeito suprimido de forma significativa pela inosina.

A função vascular foi estudada pela análise *ex vivo* da contractilidade e relaxamento dos anéis aórticos. Curva concentração – resposta a epinefrina e acetilcolina é mostrada na Figura II. III.3. Novamente o tratamento com inosina exerceu efeito protetor contra a agressão vascular produzida pela seps e recuperando a força contráctil e da resposta de relaxamento destes vasos.

Os resultados dos experimentos de mortalidade são mostrados na Figura II. III.4. No protocolo de pré-tratamento (Figura II. III.4a), os camundongos tratados com o veículo começaram a morrer entre 6 e 12 horas após a CLP, atingindo uma taxa de mortalidade de 60 e 80% em 24 e 36 h pós-CLP, respectivamente. A taxa de mortalidade total ao final do período de observação foi de 95% (1 em 19 animais sobreviveu). A inosina retardou o começo dos óbitos nos camundongos tratados. Em verdade, com 24 e 36 horas após CLP, a mortalidade neste grupo foi de 11 e 58%, respectivamente. Ao final do estudo, a sobrevida global neste grupo foi de 23% (5 de 19 camundongos estavam

vivos). Comparando as duas curvas de sobrevida, usando o teste de log-rank, mostrou significativa ($p < 0,05$) vantagem nos camundongos tratados com inosina. No protocolo de pós-tratamento (Figura II. III.4b), também observamos que a administração de inosina retardou de forma significativa o início de óbitos pós CLP. Apesar da taxa de mortalidade ao final do período de observação ter sido similar entre veículo e inosina, a comparação global das curvas de sobrevida pelo teste de log-rank evidenciou haver diferença significativa entre os dois tratamentos. Figura II. III.4c mostra os resultados dos experimentos de sobrevida quando se utilizou antibióticos em associação, inosina ou veículo como estratégia de pós-tratamento. Animais tratados com inosina mostraram uma melhora significativa na sobrevida, com uma taxa global de sobrevida de 24% ao final do período de estudo, contrastando com os 7% de sobrevida no grupo tratado com o veículo.

TABELA II. III.1. Conteúdo intracelular de NAD⁺ e NADH no fígado*

	Controle	CLP	Inosina
NAD ⁺ (nmol/mg)	19.01 ± 2.21	3.98 ± 1.24†	15.23 ± 2.82
NADH(nmol/mg)	1.21 ± 0.04	0.55 ± 0.16†	0.076 ± 0.014†‡
NAD ⁺ /NADH	14.9 ± 1.23	9.1 ± 2.83†	234.29 ± 66.72†‡

* Camundongos submetidos a choque séptico por CLP foram tratados com inosina (100 mg/kg, intraperitonalmente) ou veículo (salina isotônica) 1 hora antes e 6 horas após. NAD⁺ e NADH foram medidos por HPLC em amostras hepáticas obtidas 12 horas após a indução de CLP. Os valores

representam a média e EPM. †p < 0,05 indica veículo versus controle. ‡p < 0,05 CLP + inosina versus CLP.

Figura II. III.2. Expressão de quimiocinas MIP-1α e MIP-2 no fígado e pulmão durante CLP. Camundongos sépticos pela CLP foram tratados 1 hora antes e 6 horas após a CLP com inosina (100 mg/kg, intraperitonealmente; n =10) ou veículo (salina isotônica, 0,5 ml, intraperitonealmente; n = 10). Amostras de pulmão e fígado retiradas após 12 horas. Não houve nível detectável de MIP-1α e MIP-2 em camundongos controle (não expostos a CLP). CLP induziu um aumento expressivo nas quimiocinas no pulmão (A) e no fígado (B), um efeito que foi significativamente reduzido em animais recebendo tratamento com inosina. *p < 0,05, indica o valor versus controle; #p < 0,05, CLP + inosina versus CLP.

Figura II. III.3. Experimentos de reatividade vascular em aortas. Camundongos sépticos pela CLP foram tratados 1 hora antes e 6 horas após da CLP com inosina (100 mg/kg, intraperitonealmente; n = 10) ou veículo (salina isotônica, 0,5 ml, intraperitonealmente). Aortas torácicas (n = 5 por grupo) foram retiradas 12 horas após a CLP para medir a contração a epinefrina (superior) e relaxamento a acetilcolina (*inferior*) *ex vivo*. Em comparação às condições controle, a contratilidade vascular foi significativamente deprimida pela CLP, mas não nos animais tratados com inosina, entretanto a diferença entre os dois grupos não foi significativa. Em contraste, inosina melhorou significativamente a resposta de relaxamento a acetilcolina durante a CLP. Os valores representam média e EPM. *p < 0,05, indica valor versus controle; #p < 0,05 CLP + inosina versus CLP.

Figura II. III.4. Estudo de sobrevivência. Camundongos sépticos pela CLP foram tratados 1 hora antes e 6 horas após da CLP com inosina (100 mg/kg, intraperitonealmente; n = 19) ou veículo (salina isotônica, 0,5 ml, intraperitonealmente; n = 19). Neste experimento (a), animais tratados com inosina tiveram significativa melhora da sobrevivência durante os 7 dias de observação período (após o dia 5 não houve mudança de mortalidade entre os grupos). No segundo estudo (pós-tratamento, b), inosina (100 mg/kg, intraperitonealmente; n = 28) ou veículo (salina isotônica, 0,5 ml, intraperitonealmente; n = 36) foi administrada 1 hora após a CLP, com doses adicionais em 12 e 24 horas. Apesar da taxa de mortalidade ao final do período de observação ter sido similar entre veículo e inosina, a comparação global das curvas de sobrevivência pelo teste de log-rank evidenciou haver diferença significativa entre os dois tratamentos. Em um terceiro estudo (c), os animais submetidos a CLP foram tratados após 1 hora com antibióticos (gentamicina, 10 mg/kg e clindamicina, 300 mg/kg) aplicados no subcutâneo, em associação com inosina (100 mg/kg, intraperitonealmente; n = 26) ou veículo (salina isotônica, 0,5 ml, intraperitonealmente; n = 27). Doses adicionais de antibióticos foram administradas a cada 12 horas por 3 dias, enquanto inosina ou veículo foram repetidos após 12 e 24 horas. Inosina significativamente retardou o início dos óbitos nos animais com CLP e apresentou uma melhora da taxa de sobrevivência (24 versus 7% sobrevivência). As curvas de sobrevivência representam o sumário de dois experimentos independentes (a), 3 (b), e 3 (c). *p < 0,05, teste de log-rank.

Conclusões e possíveis implicações

Em resumo, nossos dados provêm a primeira demonstração que inosina reduz as conseqüências do choque séptico induzido pelo modelo experimental de ligadura cecal e perfuração, reduzindo a produção de citocinas, limitando a inflamação tecidual e o dano a órgãos, e melhorando a função vascular, finalmente levando a redução da mortalidade. Estes dados, em associação com o conhecimento do perfil de segurança das purinas e a falta de efeitos hemodinâmicos pode sugerir o seu uso em estudos clínicos como agente terapêutico na sepse.

III - RELEVÂNCIA DOS RECEPTORES TOLL NA ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL

(Resultados referentes aos estudos: 1- Flagellin, an novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I Kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase. Journal of Immunology, EUA, v. 15, n. 166(2), p. 1248-1260, 2001; 2- Comparison of inflammation, organ damage, and oxidant stress induced by Salmonella enterica serovar Muenchen flagellin and serovar Enteritidis of lipopolysaccharide. Infection and Immunity, v. 70, n. 1, p.192-198, 2002; 3- Flagellin from Gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis. Shock, v. 19, n. 2, p. 131-137, 2003; 4-“Avaliação temporal da regulação do tônus vascular e da produção de superóxido induzido por purinas em aorta isolada de ratos Wistar endotóxicos”)

III. I - Expressão de TLR-2 e 4 após indução de endotoxemia

Endotoxemia por LPS

O sistema imune inato é o maior responsável pelo mecanismo de defesa nos animais, ou seja, ele é responsável pela vigilância da invasão de patógenos através dos receptores para reconhecimento de padrões conservados evolutivamente, também conhecido como família de Receptores do Tipo Toll (TLR) [113].

Receptores *TOLL*

O termo *TOLL* foi originalmente descrito se referindo ao receptor de superfície celular para orientação dorso/ventral em larva de *Drosófila* [114]. Em *Drosófila* o receptor *TOLL* mostrou-se importante na proteção contra infecção por fungos. O seqüenciamento do genoma da *Drosófila* revelou a existência de nove receptores da família *TOLL* [115]. Na década de 90 foram identificadas as primeiras proteínas de mamífero relacionadas estruturalmente com o *TOLL* de *Drosófila* e foram chamadas de receptores do tipo *TOLL* (TLR) 1 e 4 [20, 116]. *TOLL* e a família de proteínas TLR são caracterizadas pela presença de um domínio extracelular rico em leucina e uma região intracitoplasmática contendo um receptor *TOLL*/interleucina-1, importante na sinalização tanto para TLR de

Drosófila quanto para TLR de mamíferos, indicando que eles tem componentes de sinalização homólogos. Na verdade, para cada elemento de sinalização encontrado para *Drosófila*, tem sido descrito um sistema homólogo para mamíferos [117].

Bactérias e fungos possuem elementos específicos que são reconhecidos pelas células do sistema imune como padrões moleculares associados ao patógeno. Recentes estudos mostram que os TLR reconhecem estes padrões moleculares associados ao patógeno [118].

O sistema imune é responsável pela rápida resposta inicial do organismo para potenciais perigos, incluindo patógenos e injúria tecidual. Dos receptores da família TLR provém a primeira linha de defesa do organismo contra possíveis infecções. A ativação destes receptores resulta em um estímulo específico para a expressão de genes que são solicitados para o controle da infecção, incluindo a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias, seguido do recrutamento de neutrófilos para o local de infecção [113].

Dos 10 membros da família de TLR descritos (TLR 1-10), potenciais ligantes também tem sido identificados para estes receptores [119, 120] e somente TLR2 e TLR4 tem implicações na sinalização por LPS [121].

TLR2

Bactéria Gram-positiva pode provocar respostas imunes similares à resposta gerada pelo LPS. De acordo com alguns autores, a habilidade do TLR2 de interagir com uma variedade de ligantes é baseado na habilidade de

formar heterodímeros com outros TLR, principalmente o TLR6 e o TLR1 [122]. Então TLR2 parece aumentar seu repertório de especificidades pela formação, ao menos, de dois tipos de heterodímeros funcionais com outros TLR [123]. Takeuchi e colaboradores [124] sugerem que o TLR2 não está associado com o LPS, por outro lado, também mostram que LPS de *Leptospira interrogans* e de *Porfiromonas gingivalis*, os quais são estruturalmente diferentes do LPS de enterobactérias, tem ativado células através do TLR2. Foi demonstrado que o TLR2 está envolvido na resposta para lipoproteínas/lipopeptídeos de *Micobacterium tuberculosis*, bactéria Gram-negativa, *Borrelia burgdorferi* e *Mycoplasma fermentans* dentre outras [119]. Os resultados obtidos por pesquisadores independentes são contraditórios, mostrando que a verdadeira função do TLR2 ainda não está bem estabelecida.

Vodovotz e colaboradores [121], descrevem um aumento da expressão gênica para TLR2 em ratos injetados com LPS, maiores quantidades foram encontrados em fígado, seguido de pulmão e baço. Descrevem ainda que em hepatócitos, as citocinas produzidas em resposta ao LPS, seguido por um aumento de expressão de TLR4, podem regular a expressão de TLR2, potenciando a resposta de infecção pelo aumento da sensibilidade para estímulos Gram-positivo.

TLR4

O LPS provoca uma grande variedade de respostas immunoestimulatórias, incluindo a produção de citocinas pro-inflamatórias

como a IL1- β , TNF- α , IL-12 e substâncias inflamatórias efetoras como o NO. CD14 expresso por fagócito mononuclear foi demonstrado ligar-se ao LPS, mas a ausência de uma porção intracitoplasmática no CD14, sugere que este ligante não tem capacidade de iniciar a transdução de sinal e que outras proteínas de membranas podem ser essenciais para a sinalização por LPS em fagócitos mononucleares [125]. Em 1998, Poltorak e colaboradores [126] mostraram que a sinalização pelo LPS é transmitida pelo TLR4. O padrão molecular associado ao patógeno melhor estudado é o do LPS, o maior componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas. O complexo receptor de LPS consiste de CD14, TLR4 e MD-2 [123].

Expressão de mRNA para TLR4, TLR2 e iNOS em pulmão e aorta.

Nós analisamos a expressão gênica de TLR2 e TLR4 no intuito de observar quanto sua expressão pode ser afetada após o estímulo de LPS e conseqüentemente a ativação inflamatória. O TLR4 pode estar envolvido por ação direta, contudo uma alteração do TLR2, representa uma regulação mediada ou por sinalização intracelular coincidente das vias TLR4 e TLR2, pela presença de lipoproteínas no LPS ou pelos mediadores inflamatórios produzidos. Homma e colaboradores [127] demonstraram que a expressão de TLR2 é fortemente regulada por citocinas (TNF- α e IFN- γ) presentes após estímulo inflamatório.

No pulmão foi observado aumento significativo na expressão gênica para TLR4 após 8 horas, seguida de diminuição em 16 horas, e pequeno aumento de expressão no período de 24 horas quando comparados com o grupo controle.

Figura III. I.10. Densitometria ótica da expressão gênica de iNOS, TLR2 e TLR4 em pulmões de animais controle e injetados com LPS 10mg/kg i.p. * $p < 0,05$ em comparação com os demais grupos.

A expressão gênica de TLR4 na aorta, teve aumento significativo após 8 horas da injeção de LPS seguida de diminuição em 16 horas e aumento da expressão no período de 24 horas quando comparado com o grupo controle.

Assim como no pulmão, a expressão gênica de TLR2 na aorta teve aumento significativo nos três períodos estudados. Provavelmente, a interação entre diferentes membros da família “toll” pode estar envolvida na resposta inflamatória, pois segundo Wyllie e colaboradores [128] a interação entre diferentes TLRs pode conferir respostas específicas na sinalização por LPS. Sinergismo entre TLR2 e TLR4 também foi estudado na indução de COX2 por bactérias na musculatura vascular [129].

Figura III. I.11. Densitometria ótica da expressão gênica de iNOS, TLR2 e TLR4 em aorta de animais controle e injetados com LPS 10mg/kg i.p. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. # $p < 0,05$ em comparação com o grupo LPS 16h.

A síntese de NO se diferencia em quantidade e tempo de liberação em decorrência do tipo de NO sintetase ativa. As enzimas constitutivas (eNOS e nNOS) sintetizam NO em pequenas quantidades, já a forma induzida (iNOS) sintetiza NO em grandes quantidades e por longos períodos excedendo até o tempo do estímulo inflamatório de uma infecção [130]. Perante o estímulo inflamatório, a indução de expressão gênica de iNOS ocorre em diversos tipos de células: endotelial, muscular lisa, macrófago. Este fato acarreta maior quantidade de NO durante sepsis e esta substância é responsável por aumento de permeabilidade e redução da resistência vascular, ativação de neutrófilo e macrófago [131].

No grupo com 8 horas após injeção de LPS foi encontrado pico de expressão gênica para iNOS tanto em pulmão quanto em aorta. Nos períodos de 16 e 24 horas após a injeção de LPS os níveis de expressão gênica para iNOS voltaram aos níveis basais no pulmão, enquanto na aorta a diminuição foi gradativa, mas sem retornar aos níveis basais. A dosagem de nitrato (subproduto do NO), mostrou que o pico de sua produção ocorre em 16 horas sendo, portanto posterior ao aumento da enzima. O radical livre NO (precursor do nitrato) desempenha funções de sinalização celular, vasodilatação, inflamação e participa também na produção de lesão tecidual [130].

III. II - Efeitos sistêmicos da ativação de TLR4 e 5

Inflamação, lesão de órgãos, e estresse oxidativo induzido por Flagelina da *Salmonella entérica* sorotipo Muenchen ou pelo Lipopolissacarídeo da *Salmonella entérica* sorotipo Enteritidis

Classicamente é conhecido que a resposta inflamatória sistêmica é desencadeada em grande parte pelo constituinte da parede celular das bactérias gram-negativas o lipopolissacarídeo (LPS) [132]. Contudo, diferenças importantes distinguem o choque induzido pelo LPS e o induzido por bactérias, é notório em respeito à cinética e distribuição da expressão dos genes proinflamatórios, que limitam as inferências a serem concluídas a partir dos modelos endotoxêmicos [133]. Muitas diferenças entre os efeitos do LPS versus bactéria viva suportam o conceito que componentes bacterianos distintos do LPS são substâncias adicionais no desencadeamento da inflamação sistêmica e choque durante o curso de infecções graves por bactérias gram-negativas. Um candidato é o componente flagelina, uma das principais subunidades da proteína no filamento flagelar dos microorganismos móveis [134, 135]. Em adição ao seu papel primário como um componente estrutural do flagelo bacteriano, flagelina pode atuar como uma endotoxina,

sendo liberada a partir das bactérias gram-negativas móveis *in vitro* [136, 137] tendo sido detectada no sangue de ratos sépticos [136]. Estudos recentes indicam que flagelina ativa a translocação nuclear do NF- κ B e induz a liberação pelo hospedeiro de mediadores proinflamatórios *in vitro* e *in vivo* [136, 138-142]. Esforços em identificar as vias de sinalização destes efeitos levaram a recente demonstração que flagelina liga-se e ativa o receptor Toll-like 5 (TLR5) com conseqüente ativação do receptor quinase associado a interleucina 1 (IRAK) [141, 143]. Nesta parte do trabalho investigamos o papel da flagelina como um mediador proinflamatório, comparando seus efeitos aos do LPS (neste estudo ambas substâncias são de *Salmonella*), focalizando sob o desenvolvimento de inflamação sistêmica, a infiltração de células polimorfonucleares, a geração de estresse oxidativo nos tecidos, e a ocorrência de lesão a órgãos.

Evolução temporal das citocinas e nitrato plasmáticos. LPS e flagelina induziram significativa liberação do TNF- α , interferon gama (IFN- γ), IL-6, e IL-10, ver Tabela III.II.1. Em relação ao LPS, as diferentes citocinas (exceto IFN- γ) mostraram um pico máximo precoce seguido de progressiva queda. O aumento nas citocinas produzido pela flagelina foi menor do que pelo LPS, e sua evolução temporal foi diferente. Os níveis de TNF- α e IL-10 estavam elevados em 1 h e permaneceram estáveis a seguir, enquanto a IL-6 diminuiu lentamente em 4 e 8 h, após sua liberação precoce em 1 e 2 h. Em relação ao IFN- γ , a evolução temporal de seu aumento foi semelhante entre LPS e

flagelina, marcada por uma progressiva liberação, começando a partir da segunda hora pós-injeção.

TABELA III. II.1. Evolução temporal das citocinas plasmáticas.

Citocina

Conc. citocina (pg/ml):

Controle		1h		2h		4h		8h	
		L	F	L	F	L	F	L	F
TNF-α	0	2,800 $\pm$ (447)	386* $\pm$ (50)	1,898 $\pm$ (123)	144* $\pm$ (13)	588 $\pm$ (67)	247* $\pm$ (176)	245 $\pm$ (138)	358 $\pm$ (144)
IFN-γ	0.2 $\pm$ (0.2)	1.7 $\pm$ (1.2)	2.3 $\pm$ (1.9)	72 $\pm$ (21)	86 $\pm$ (29)	989 $\pm$ (165)	430* $\pm$ (59)	1,312 $\pm$ (238)	430* $\pm$ (54)
IL-6	13 $\pm$ (4)	4,629 $\pm$ (1,149)	549* $\pm$ (83)	20,197 $\pm$ (1,810)	651* $\pm$ (119)	9,934 $\pm$ (340)	290* $\pm$ (22)	5,558 $\pm$ (860)	277* $\pm$ (39)
IL-10	11 $\pm$ (8)	1,388 $\pm$ (252)	83* $\pm$	1,801 $\pm$ (476)	98* $\pm$ (17)	1,061 $\pm$ (194)	97* $\pm$ (18)	356 $\pm$ (52)	75* $\pm$ (17)

a – Camundongos foram desafiados com injeção i.v. de *S. entérica* sorotipo Enteritidis LPS (L) ou flagelina de *S. entérica* sorotipo Muenchen (F), ambas em concentrações de 4 mg/kg (100 μ g/camundongo). Um grupo de cinco camundongos não recebeu LPS ou flagelina para obtenção de valores controle. Os camundongos foram sacrificados após 1, 2, 4 e 8 horas, e o plasma coletado para as dosagens de citocinas circulantes. $n = 9$ a 10 camundongos/grupo para cada ponto temporal.

b Os valores são a média e erro padrão nos parêntesis. *, $P < 0.05$ para o LPS versus flagelina. Todos os valores nos grupos L e F foram significativamente maiores do que nos animais controle.

Os efeitos de LPS e flagelina em doses menores e na co-administração de ambos, sobre os níveis de TNF- α e IL-6 são apresentados na Fig. III. II.1. Comparando-se o efeito sobre cada citocina em particular, a liberação de

ambas as citocinas foi aumentada quando LPS e flagelina foram injetados juntos. Em 1 h, os níveis de TNF- α foram de 2.241 ± 704 (LPS), 288 ± 41 (flagelina), e 4.293 ± 476 pg/ml (LPS + flagelina; $P < 0,05$ versus LPS ou flagelina), enquanto os níveis de IL-6 em 4 h atingiram 6.575 ± 166 (LPS), 470 ± 42 (flagelina), e 8.084 ± 225 pg/ml (LPS + flagelina; $P < 0,05$ versus LPS ou flagelina).

Figura III. II.2 delinea a evolução temporal do nitrito plasmático, um indicador da produção de NO, após a administração de flagelina ou LPS. Comparando-se aos valores controle ($31,2 \pm 4,7 \mu\text{M}$), a injeção de ambas as toxinas aumentou marcadamente o nitrato plasmático em 4 e 8 horas. Os níveis atingidos pelo LPS foram significativamente maiores do que com flagelina (em 8 horas, os valores foram de $368,5 \pm 24,6$ e $226,4 \pm 12,1 \mu\text{M}$ respectivamente).

Figura III. II.2 delinea a evolução temporal do nitrito plasmático, um indicador da produção de NO, após a administração de flagelina ou LPS. Comparando-se aos valores controle ($31,2 \pm 4,7 \mu\text{M}$), a injeção de ambas as toxinas aumentou marcadamente o nitrato plasmático em 4 e 8 horas. Os níveis atingidos pelo LPS foram significativamente maiores do que com flagelina (em 8 horas, os valores foram de $368,5 \pm 24,6$ e $226,4 \pm 12,1 \mu\text{M}$ respectivamente).

Conteúdos de TBARS e glutathiona reduzida nos tecidos. No pulmão (Fig. III. II.3A), intestino (Fig. III. II.3B), e fígado (Fig. III. II.3C), os níveis de TBARS mostraram um significativo aumento após a administração de flagelina, principalmente após 8 horas. No coração (Fig. III. II.3E), flagelina aumentou os conteúdos de TBARS somente em 4 h. No rim (Fig. III. II.3D), apesar da flagelina aumentar a formação de TBARS, este efeito não atingiu significância estatística na comparação com animais controle. Em contraste, LPS somente aumentou a formação de TBARS no pulmão após 4 horas e no intestino após 8 horas. Os níveis de TBARS foram de $6,01 \pm 0,61$ (LPS), $7,25 \pm 0,57$ (flagelina), e $7,24 \pm 0,46$ (LPS+ flagelina) nmol/mg de proteína.

Figura III.II.3 delinea a evolução temporal do TBARS tecidual, um indicador de estresse oxidativo, após a administração de flagelina ou LPS. Comparando-se aos valores controle, a injeção de LPS e flagelina aumentaram O TBARS no pulmão, intestino, fígado e coração sem alterar o renal.

A quantidade de glutathione reduzida no tecido (Fig. III. II.4) diminuiu de forma equiparável no pulmão (Fig. III. II.4 A), intestino (Fig. III. II.4B), e rim (Fig. III. II.4D) após flagelina ou LPS. No fígado (Fig. III. II.4C), o efeito de flagelina foi significativamente maior após 8 horas. Flagelina diminuiu os níveis de glutathione reduzida no coração, enquanto o LPS não produziu este efeito (Fig. III. II.4E).

Figura III.II.4 delinea a evolução temporal do glutatona tecidual, um indicador indireto estresse oxidativo pois é consumido na sua função de remover o superóxido, após a administração de flagelina ou LPS. Comparando-se aos valores controle, a injeção de LPS e flagelina reduziram O TBARS no pulmão, intestino, fígado, coração e renal.

Atividade de MPO tecidual. Figura 5 ilustra os valores de atividade de MPO em diferentes órgãos. NO pulmão (Fig. III. II.5A), LPS e flagelina ativaram o recrutamento de neutrófilos de forma importante, em 4 horas foi significativamente maior com flagelina, enquanto não houve diferença no período de 8 horas. No intestino (Fig. III. II.5B), flagelina não influenciou a atividade de MPO, por outro lado LPS induziu significante aumento de MPO após 8 horas. No fígado (Fig. III. II.5C) e rim (Fig. III. II.5D), não houve mudanças significativas no MPO em relação aos valores dos controles. Por fim, no coração (Fig. III. II.5E), ocorreu marcada redução de MPO, indicativo de

redução nos neutrófilos residentes neste órgão, isto foi observado tanto em animais recebendo LPS quanto flagelina.

A atividade de MPO foi também determinada no pulmão após 4 horas da administração de baixas doses de LPS ou flagelina separados ou em associação. A quantidade de MPO elevou-se seguindo a administração de ambas as toxinas em separado (LPS, 263 ± 38 mU/mg proteína), (flagelina, 307 ± 19 mU/mg proteína), a co-administração não produziu um maior incremento na MPO (LPS + flagelina, 268 ± 30 mU/mg de proteína; *P* não é significante versus LPS ou flagelina).

Figura III.II.5 delinea a evolução temporal do MPO tecidual, um indicador de infiltrado neutrofílico, após a administração de flagelina ou LPS. Comparando-se aos valores controle, a injeção de LPS e flagelina aumentaram o MPO no pulmão, intestino e coração sem alterar o renal e hepático.

Níveis plasmáticos de aminotransferases e uréia. Os resultados das dosagens de ALT, AST, e uréia foram determinados 4 horas após a injeção de LPS ou flagelina, e são apresentados na Fig. III. II.6. LPS e flagelina induziram um significativo aumento no ALT plasmático (Fig. III. II.6A), indicativo de injúria hepática, com maior repercussão nos animais que receberam flagelina (controles, $34,8 \pm 7,8$ IU/ L; LPS, $83,1 \pm 10,1$; flagelina, $131,2 \pm 24,3$ UI/I). Flagelina também induziu um aumento em AST (Fig. III. II.6B) que não foi observado após LPS. A análise da uréia plasmática mostrou um aumento significativo somente em camundongos tratados com LPS, enquanto a flagelina não alterou este parâmetro (Fig. III. II.6C).

Figura III.II.6 Delineia a evolução temporal das quantidades plasmáticas de ALT, AST e uréia, marcadores bioquímicos de lesão hepática e renal, após a administração de flagelina ou LPS.

Estudos recentes têm indicado que a flagelina, o principal componente do flagelo bacteriano, pode ativar a resposta do sistema imunológico inato em mamíferos por induzir a mobilização do fator de transcrição nuclear NF- κ B e a expressão de vários genes proinflamatórios [136, 138-142]. Dois relatos recentes [143] têm demonstrado que estes efeitos são mediados pela ligação ao receptor semelhante ao Toll 5 (TLR5) e início de autofosforilação da porção intracitoplasmática [143] e do IRAK (20) pela flagelina. O complexo IL-1 receptor–TLR (IL-1/TLR) é uma família de proteínas pertencente ao grupo de proteínas recentemente denominadas “receptores reconhecedores de padrão” [144], responsáveis pela mediação da resposta imunológica inata seguindo a interação com vários padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) [145]. LPS é outro PAMP, que em contraste a flagelina, liga-se ao receptor CD14 e então ativa o receptor TLR4 [126, 146, 147]. Enquanto o papel do LPS como um componente proinflamatório importante liberado pela bactéria gram-negativa é amplamente estabelecido, a via de sinalização flagelina-TLR5 está emergindo como um novo conceito na interação de bactérias móveis com organismos eucariontes. Neste estudo investigamos os efeitos da flagelina in vivo, focalizando na liberação sistêmica de mediadores proinflamatórios e o desenvolvimento de alterações inflamatórias nos órgãos alvo mais relevantes comparando estes efeitos aos de LPS.

Desenvolvimento de inflamação sistêmica após a administração de flagelina.

Em acordo com estudos prévios [136], observamos que flagelina ativou uma resposta inflamatória sistêmica prototípica, caracterizada pela produção de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-6, e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10) (Tabela III. II.1). Enquanto a magnitude desses efeitos foi menor do que para o LPS, um achado importante e novo foi que a liberação de citocinas pro-inflamatórias foi significativamente aumentada quando ambas as toxinas foram administradas juntas em baixas doses (10 μ g/camundongo) (Fig. III. II.1). Cabe aqui ressaltar que estas doses estão dentro da faixa de concentrações de flagelina circulante livre (0,4 a 2 μ g/ml) que podem ser medidas nos ratos com sepse por gram-negativos. Esta sinergia, que suporta a existência de comunicação cruzada entre as vias de sinalização TLR4 e TLR5, pode representar um importante mecanismo para amplificar os sinais proinflamatórios necessários para combater os microrganismos invasores.

Alternativamente, esta sinergia pode favorecer o desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica esmagadora e destrutiva que caracteriza o choque séptico. A falência cardiovascular na sepse é relacionada ao aumento da produção de NO seguindo a expressão da NO sintetase induzível (iNOS) [148]. O LPS é um indutor da expressão de iNOS, fato bem estabelecido na literatura, nossos dados apresentam evidências de que flagelina é capaz, também, de elevar a síntese de NO (Fig. III. II.2). Estes dados, que confirmam nossos achados anteriores [136], indicam que flagelina pode em conjunto com

LPS, ser um importante mediador do choque circulatório na sepse por gram-negativo.

Flagelina induziu estresse oxidativo difuso. Dano celular pelo estresse oxidativo é um mecanismo de lesão de órgãos e disfunção na sepse por gram-negativo [149]. Desta forma o estresse oxidativo difuso induzido pela flagelina, evidenciado por um aumento significativo da formação de TBARS (Fig. III. II.3), concomitante a uma redução do conteúdo tecidual de glutathione na forma reduzida (GSH) (Fig. III. II.4), é um achado importante e clinicamente relevante do presente estudo. É interessante realçar o contraste da maior ação do LPS sobre a produção sistêmica de citocinas, enquanto a flagelina desenvolve maior nível de efeito pro-oxidante no tecidos. Esta diferença de efeito sugere que LPS e flagelina ativam mecanismos efetores imunológicos diferentes. Nossos dados suportam que a ativação do TLR5 pela flagelina inicia uma resposta do hospedeiro prototípica, que resulta na geração de um estresse oxidativo difuso. Um relato mostrou que a interação de lipoproteínas bacterianas com TLR2 ativa as células a produzir espécies reativas de oxigênio [150]. Portanto, a geração de espécies oxidantes parece ser uma consequência importante da sinalização via TLR, que serve como um mecanismo primário de defesa contra os patógenos invasores.

Flagelina recruta neutrófilos para o pulmão. A síndrome do desconforto respiratório agudo (SARA) é uma complicação freqüente da sepse, relacionada em parte à infiltração e ativação de neutrófilos no pulmão [151]. Modelos experimentais têm demonstrado que LPS é um ativador da SARA em sepse

por gram-negativos [152-154]. Nós identificamos a flagelina como outro componente bacteriano causador de infiltração neutrofílica nos pulmões (Fig. III. II.5), observação consistente com estudos prévios mostrando que a injeção intratraqueal de flagelina provoca uma pneumonite em camundongos [155]. É interessante, que nós não encontramos aumento de MPO em resposta a flagelina em outros órgãos (coração, intestino e fígado), enquanto o LPS recrutou neutrófilos para o intestino. Isto sugere uma interação em particular da flagelina com a circulação pulmonar, resultando em mobilização geral de neutrófilos da periferia para os pulmões.

LPS e flagelina exercem efeitos contrastantes na lesão de órgãos. Lesão e disfunção hepática são características da falência de múltiplos órgãos que complica o choque séptico [156]. Os dados apresentados sustentam o possível papel da flagelina como um iniciador destas anormalidades. Em verdade, administração de flagelina foi associada com o desenvolvimento de dano hepático, indicado por um aumento de aminotransferases plasmáticas (Fig. III. II.6A e B), significativamente mais pronunciada do que após administração de LPS.

Diferente da ação sobre o fígado, LPS e não a flagelina, induziu dano renal (Fig. III. II.6C). LPS produz um padrão hipodinâmico de redistribuição do fluxo sangüíneo sistêmico [157, 158]. A redução da perfusão renal observada nestas condições é responsável por um aumento precoce da uréia plasmática [159, 160]. Apesar de flagelina também induzir hipotensão arterial em camundongos [136], seus efeitos sobre o fluxo sangüíneo sistêmico e regional

são desconhecidos até o momento. Entretanto, a não elevação de uréia no plasma em resposta a flagelina sugere de forma indireta que o padrão hemodinâmico é diferente do LPS, hipótese que necessita ser caracterizada em detalhes.

Conclusões. Há um crescente corpo de evidências que indicam que a flagelina, uma subunidade do flagelo bacteriano, representa um mediador importante da inflamação decorrente de bactérias gram-negativas. Estes dados corroboram este conceito emergente, por mostrar que flagelina tem forte ação pro-oxidante e pro-inflamatória in vivo.

IV – PAPEL DA POLI (ADP-RIBOSE) POLIMERASE NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

(Referente aos estudos: 1- Activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. American Journal Respiratory Critical Care Medicine, v. 165, n. 3, p. 372-377, 2002; 2- Novel phenanthridinone inhibitors of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase: potent cytoprotective and antishock agents. Critical Care Medicine, v. 30, n. 5, p. 1071-1082, 2002; 3- Resistance to acute septic peritonitis in poly (ADP-ribose) polymerase-1- deficient mice. Shock, v. 17, n. 4, p. 286-292, 2002; 4- Poly(ADP-ribose) synthetase mediates intestinal mucosal barrier dysfunction after mesenteric ischemia. Shock, EUA, v. 14, n. 2, p. 134-141, 2000; 5- Protection against hemorrhagic shock in mice genetically deficient in poly(ADP-ribose)polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, EUA, v. 97, n. 18, p. 10203-10208, 2000; 6- Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. Circulation Res., v. 89, n. 8, p. 684-691, 2001; 7- Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly (ADP-ribose) polymerase activation. Nature Medicine, EUA, v. 7, n. 1, p. 108-113, 2001.)

IV I– PAPEL DA POLI (ADP-RIBOSE) POLIMERASE NA LESÃO TECIDUAL INDUZIDA PELA SEPSIS

Aproximadamente 25% a 35% de todos os episódios sépticos terminam em óbito [5, 161, 162], enquanto que os pacientes sofrendo de peritonite bacteriana apresentam uma taxa maior de mortalidade que se situa entre 60% to 80% [163]. A resposta pro-inflamatória exacerbada freqüentemente está associada com a produção de citocinas e pode resultar em muitas lesões e evolução fatal da doença [164]. Devido ao vasto número de mediadores envolvidos, é provável que tratamentos capazes de modular os diversos aspectos amplificadores da inflamação serão mais eficientes do que estratégias direcionadas a um simples mediador [133, 165].

Tem se acumulado evidências que um importante mecanismo de injúria tecidual durante estresse oxidativo é a ativação da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), uma enzima presente em grandes quantidades no núcleo das células eucariontes [166]. Ativação da PARP é dada pela quebra de uma das fitas do DNA decorrente da ação de agentes oxidantes, a atividade desta enzima inicia um ciclo intracelular fútil de consumo de energia, conduzindo a rápida depleção dos estoques celulares de NAD e ATP, resultando em disfunção e morte celular do tipo necrótico [166]. A quebra de uma fita de DNA, ativação da PARP, e morte celular têm sido amplamente demonstradas *in vitro* nas células expostas a vários radicais livres de oxigênio [166, 167], assim como em células expostas

ao peroxinitrito uma espécie reativa de nitrogênio formada a partir da rápida reação de óxido nítrico (NO) com o superóxido [168, 169]. Ativação da PARP *in vivo* tem sido demonstrada atuar como um efector comum do dano dependente de oxidantes em diversas condições fisiopatológicas, incluindo isquemia-reperfusão [170], inflamação localizada [171, 172] e choque endotóxico [173]. Em particular, dados recentes têm indicado que a formação de peroxinitrito ocorre na sepse [109]. Estas observações indicam que as condições necessárias para a ativação da PARP estão presentes na síndrome séptica. Entretanto, o papel da PARP na sepse não tem sido bem definido até o momento; os modelos de choque induzido pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou outros tipos de componentes bacterianos são freqüentemente criticados por sua relevância limitada para o estabelecimento de uma relação com o quadro de sepse clínica. Em verdade, o efeito protetivo do bloqueio de fatores inflamatórios no choque induzido pelo LPS não se traduziu em proteção nos modelos animais induzidos por bactérias vivas [133, 164]. No presente estudo avaliamos o papel potencial da ativação da PARP na sepse pela ligadura e punção cecal (CLP) realizada em camundongos selvagens e nos geneticamente modificados pela inativação do gene codificador da PARP. Nossos estudos suportam o conceito de que o bloqueio da PARP durante a sepse experimental reduz a resposta inflamatória exagerada, reduz o dano a órgãos, e aumenta a sobrevida.

Concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato estavam significativamente elevadas nos animais com CLP quando comparados com o grupo com falsa cirurgia. Porém, não foi observada diferença de nitrito entre os grupos selvagem e $\text{PARP}^{-/-}$ após CLP (Fig. 1). O valor de TBARS é ilustrado na Figura 2. Houve aumento de TBARS no intestino e pulmão em resposta a CLP, em particular no período de 24 horas. As concentrações de TBARS em camundongos $\text{PARP}^{-/-}$ foram semelhantes às dos animais $\text{PARP}^{+/+}$. O conteúdo de TBARS no fígado de animais selvagem estava elevado em 12 horas, seguido por um decréscimo em 24 horas pós CLP. Os respectivos valores de TBARS nos animais $\text{PARP}^{-/-}$ foram inferiores em ambos períodos de tempos estudados. A análise por imunohistoquímica mostrou marcação positiva para nitrotirosina no intestino de ambos os grupos, selvagem e $\text{PARP}^{-/-}$ (Fig. IV. 3A), indicando a presença de estresse nitrosativo nestes tecidos. Figura IV.3B também mostra marcação para poli (ADP ribose), que é o produto da atividade da enzima PARP e é utilizado como indicador do aumento de ativação da PARP. Camundongos da linhagem selvagem mostraram um aumento temporal da marcação. Em contraste, camundongos $\text{PARP}^{-/-}$ não apresentaram marcação para poli(ADP ribose) em 6 horas (dados não apresentados), 12 ou 24 horas (Fig. IV.3B)

FIG. IV.1. **Concentrações de nitrito/nitrato na CLP: o papel da PARP.** A CLP foi produzida em animais linhagem selvagem e $PARP^{-/-}$ ($n = 6$ em cada grupo). Nitrito + nitrato foi quantificado em 12 e 24 horas após a sepse. O desenvolvimento de sepse foi seguido de aumento da produção de NO, e não houve diferença entre selvagem e $PARP^{-/-}$. Os dados são apresentados em média $\pm$ EPM. * $P < 0.05$ indica um aumento significativo dos valores de nitrito + nitrato em comparação com animais sem sepse.

FIG. IV.2. **MDA no intestino, pulmão e fígado em animais com CLP: importância da PARP.** CLP foi induzida em animais $PARP^{+/+}$ e $PARP^{-/-}$ ($n = 6$ em cada grupo). As amostras de cada órgão foram coletadas após 12 e 24 h. CLP induziu significativo aumento do conteúdo de MDA nos tecidos, este fato foi mais notório no intestino e pulmão. Camundongos $PARP^{-/-}$ não apresentaram diferenças significantes nas quantidades de MDA tecidual quando comparados com os animais do tipo selvagem. Os

dados são apresentados em média $\pm$ EPM. * $P < 0.05$ indica aumento significativo em relação ao basal; # $P < 0.05$ indica diferença significativa entre selvagem e PARP^{-/-} no mesmo tempo de evolução.

FIG. IV.3. Nitrotirosina e poli(ADP ribose) marcação no intestino de camundongos submetidos a CLP. CLP foi induzida em camundongos PARP^{+/+} e PARP^{-/-} (n = 6 em cada grupo). Amostras de intestino foram coletadas após 12 e 24 horas. (A): Houve marcação positiva para nitrotirosina em animais submetidos a CLP, mostrando a presença de estresse nitrosilativo, um elemento necessário para a ativação da PARP. Não houve diferença na intensidade de coloração para nitrotirosina entre camundongos PARP^{+/+} e PARP^{-/-}. (B): CLP em camundongos da linhagem selvagem induziu a formação de poli(ADP ribose), mas a ativação da PARP estava ausente nos camundongos PARP^{-/-}.

Concentrações plasmáticas de citocinas são ilustradas na Figura IV.4. A CLP apresentou aumento das concentrações de todas as citocinas dosadas. As citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-6 foram significativamente inferiores

no plasma de $\text{PARP}^{-/-}$. Por exemplo, os valores de $\text{TNF-}\alpha$ foram 1378 ± 123 vs. 934 ± 146 pg/ml em 12 horas e 1529 ± 122 vs. 1059 ± 166 pg/mL em 24 horas nos camundongos selvagens e $\text{PARP}^{-/-}$, respectivamente. Os valores de IL-6 foram reduzidos de forma similar em animais deficientes em PARP. O mediador anti-inflamatório IL-10 foi significativamente inferior nos animais $\text{PARP}^{-/-}$ em 24 horas (6875 ± 2076 pg/mL vs. 4750 ± 2274 pg/mL).

FIG. IV.4. Concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6, e IL-10 na CLP: papel da PARP. A CLP foi realizada em animais do tipo selvagem e $\text{PARP}^{-/-}$ ($n = 6$ em cada grupo). Concentrações plasmáticas de citocinas pro- e antiinflamatórias foram medidas em 12 e 24 h após sepse. Os camundongos $\text{PARP}^{-/-}$ apresentaram redução na concentração de TNF- α e IL-6 em 12 e 24 h, enquanto a IL-10 foi reduzida somente em 24 h. Os dados mostrados representam a média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ indica um aumento significativo de citocinas quando comparado ao basal; # $P < 0,05$ indica diferença significativa entre camundongos do tipo selvagem e $\text{PARP}^{-/-}$ no momento correspondente.

A quantificação da atividade de MPO é apresentada na Figura IV.5. A evolução temporal do conteúdo de MPO mostra maior quantidade em 24 do que 12 horas, no intestino e pulmão de ambos os grupos de animais, indicando acúmulo de neutrófilos nestes tecidos. Entretanto, os camundongos PARP^{-/-} tiveram menor acúmulo de neutrófilos em resposta a CLP. O fígado também mostrou um aumento em 12 e 24 horas nos animais selvagens, e os PARP^{-/-} foram protegidos da inflamação em 12 horas.

FIG. IV.5. Atividade de MPO no intestino, pulmão e fígado em animais submetidos a CLP: o papel da PARP. CLP foi induzida em camundongos selvagens e PARP^{-/-} (n = 6 em cada grupo). Amostras dos órgãos foram coletadas após 12 e 24 horas. CLP induziu um aumento na atividade de MPO nos tecidos.

Os camundongos PARP^{-/-} apresentaram redução significativa nos conteúdos teciduais de MPO quando comparado ao tipo selvagem. Os dados são apresentados em média $\pm$ EPM. * $P < 0.05$ indica um aumento significativo no conteúdo de MPO quando comparado com animais sem sepse; # $P < 0.05$ indica diferença significativa entre camundongos selvagens e PARP^{-/-} em cada ponto temporal estudado.

Tabela –Papel da PARP no desenvolvimento da disfunção hepática e renal na sepse.

	Sham		CLP 12 h		CLP 24h	
	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-
AST	64,7 $\pm$ 9,1	55,0 $\pm$ 9,6	687,9 $\pm$ 91,5*	377 $\pm$ 99,9#	850,0 $\pm$ 97,9*	512,8 $\pm$ 76,6#
Nit.Ur.	29,3 $\pm$ 0,9	29,7 $\pm$ 1,2	72,2 $\pm$ 1,8*	49,9 $\pm$ 7,7#	94 $\pm$ 5,9*	59,5 $\pm$ 3,6#
Creat	0,25 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,07*	0,9 $\pm$ 0,05#	0,6 $\pm$ 0,05*	0,4 $\pm$ 0,09#

AST: aspartato aminotransferase; Nit. Ur. – nitrogênio de uréia no sangue; Creat. ; creatinina. * $P < 0,05$ sham vs. CLP; # $P < 0,05$ PARP^{+/+} vs. PARP^{-/-}, no mesmo momento.

A tabela IV.1 contém os resultados dos diferentes parâmetros bioquímicos que mostram injúria tecidual (fígado: AST; renal: creatinina e nitrogênio uréico sanguíneo). Houve significativa redução de AST e BUN nos animais PARP^{-/-}, indicando proteção ao desenvolvimento de dano orgânico durante o curso da sepse na CLP. Entretanto, as concentrações de creatinina, um indicador mais específico da função glomerular, não apresentou diferenças entre camundongos selvagens e PARP^{-/-}. As concentrações de BUN são também uma expressão de alterações metabólicas e do estado volêmico, que é uma relação da hidratação e extravasamento de plasma.

FIG. IV.6. **Experimentos de sobrevivência em CLP: papel da PARP.** CLP foi induzida em $PARP^{+/+}$ e $PARP^{-/-}$ ($n = 25$ para cada grupo). Os animais foram observados por 4 dias, e a mortalidade foi registrada a cada 12 horas. Nos camundongos $PARP^{-/-}$ houve significativo retardo no início dos óbitos em resposta a CLP, com uma redução da mortalidade ao final do período de observação (80% nos camundongos $PARP^{-/-}$ vs. 96% nos camundongos $PARP^{+/+}$). Após o quinto dia não foi observada alteração na mortalidade em nenhum dos grupos experimentais. $*P < 0.05$, teste Log-Rank.

Os resultados dos experimentos de sobrevivência são mostrados na Figura IV.6. No grupo $PARP^{+/+}$, os primeiros óbitos ocorreram em 12 horas após a CLP, atingindo taxas de mortalidade de 30% e 60% em 24 e 36 horas pós CLP, respectivamente. A taxa total de mortalidade ao final de 4 dias de observação foi 96% (1 em 25 animais sobreviveu). O início dos óbitos foi retardado nos

camundongos $\text{PARP}^{-/-}$. Em verdade, em 24 e 36 horas após CLP, a mortalidade neste grupo foi 12% e 48%, respectivamente. Ao fim do estudo, a mortalidade global neste grupo foi 80% (5 em 25 camundongos vivos). A comparação das curvas de sobrevida mostrou significativa redução de mortalidade nos animais $\text{PARP}^{-/-}$.

O presente estudo responde às seguintes questões: A inativação do gene decodificador da PARP pode reduzir o cenário inflamatório da sepse no modelo de CLP experimental? Em decorrência dos dados acumulados sobre o bloqueio de citocinas mostrando-se protetor nos modelos de LPS, porém prejudicial nos modelos de sepse polimicrobiana, a questão que se coloca é a inativação da PARP é deletéria ou benéfica no modelo de CLP?

Demonstramos que animais $\text{PARP}^{-/-}$ são protegidos em muitos dos parâmetros inflamatórios aferidos neste estudo, e tiveram uma clara redução de mortalidade em comparação com os animais $\text{PARP}^{+/+}$. Em adição, muitas das alterações fisiopatológicas analisadas em 12 e 24 horas pós-CLP (i.e., o pico de citocinas), recrutamento tecidual de neutrófilos (intestino, pulmão e fígado) foram atenuados nos camundongos $\text{PARP}^{-/-}$.

A PARP é uma enzima nuclear ligada ao DNA, e está envolvida na resposta celular à injúria do DNA apesar de que sua função fisiológica completa permanece sem ter sido plenamente esclarecida [166, 174]. O mecanismo necessário e obrigatório para ativar a PARP é a presença de

quebras e fendas na dupla hélice de DNA, que podem ser induzidas por uma variedade de estímulos, incluindo radicais livres e várias espécies oxidantes [166, 174].

Peroxinitrito, o produto da reação do NO com o radical superóxido é possivelmente o maior desencadeador desta seqüência de eventos [166, 174]. Uma vez que se deu a ativação, a PARP consome o NAD e leva a queda do ATP celular, eventualmente resultando em morte celular necrótica [166, 174]. Quebra de uma única hélice de DNA e ativação da PARP tem sido demonstrado representar um dos maiores fatores na injúria celular que ocorre em várias condições fisiopatológicas associadas com a formação de oxidantes e radicais livres tais como choque endotóxico [109, 173], inflamação local ou sistêmica [172], injúria de isquemia e reperfusão [170], e diabetes mellitus, assim como suas complicações vasculares [175].

Papel da PARP na sepse

SepsE e choque séptico estão associados com o desenvolvimento de estresse oxidativo sistêmico [109, 164]. Em concordância com estas observações, quebra de hélice única de DNA, consumo de NAD, e bloqueio da respiração mitocondrial têm sido documentados em células estimuladas com LPS [174, 176, 177]. Evidências recentes têm indicado que o bloqueio farmacológico da PARP com as mais diversas classes de inibidores farmacológicos tem se mostrado eficiente em melhorar a evolução final do choque endotóxico a LPS [178]. Em adição, camundongos PARP^{-/-} são resistentes ao desafio com doses letais de LPS [173]. Os resultados do estudo

atual, demonstrando que a ativação da PARP em animais PARP^{+/+} e a significativa proteção contra a sepse polimicrobiana induzida pela CLP em camundongos geneticamente deficientes em PARP, aponta para o potencial papel patogénico da PARP na sepse polimicrobiana.

Papel da PARP na produção de mediadores inflamatórios associados com sepse

Foi demonstrado que a PARP-1 é funcionalmente associada com o fator de transcrição NF- κ B; na ausência da PARP, a liberação *in vivo* de mediadores inflamatórios é reduzida porque a transcrição dependente de NF- κ B é comprometida [173]. Entretanto, é claro que muitos outros fatores bacterianos devem estar envolvidos na patogénese da CLP. Portanto, serão necessários estudos futuros para delinear os mediadores e vias intracelulares exatos levando a ativação da PARP na CLP.

Até o momento a estratégia de bloquear mediadores proinflamatórios tem sido útil apenas no choque induzido pelo LPS, enquanto tem falhado em infecções bacterianas, especialmente nos estudos em humanos [165]. Em geral, tem sido presumido que estes mediadores exercem efeitos deletérios quando em concentrações muito elevadas; por outro lado, tem sido proposto que a inibição total destas citocinas na sepse é prejudicial porque é necessária uma quantidade apropriada de citocinas para eliminar as bactérias [179, 180].

O adequado equilíbrio entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias pode reduzir o dano ao próprio hospedeiro e manter a atividade bactericida necessária protegendo da inflamação exagerada e da invasão e proliferação bacteriana [179, 180]. A redução parcial de TNF- α e IL-6 em animais PARP^{-/-} submetidos a CLP é relacionada a uma menor inflamação sistêmica, e o contra-balanço com menores quantidades de citocinas anti-inflamatórias. Em resumo, nós observamos que a despeito de concentrações reduzidas de citocinas tanto pró quanto anti-inflamatórias, a taxa de sobrevivência foi significativamente elevada.

A regulação da produção de citocinas pela PARP é um fenômeno aparentemente dependente de estímulo deflagrador. Por exemplo, Oliver e colaboradores [173] mostraram que camundongos PARP^{-/-} desafiados com LPS apresentaram quantidades de IL-6 semelhantes aos animais PARP^{+/+}, enquanto nós encontramos que no modelo de CLP as concentrações plasmáticas de IL-6 são menores na ausência da proteína PARP. Assim como as quantidades de nitrito e nitrato têm sido relatadas estarem reduzidas na ausência de PARP funcional nas situações de células estimuladas *in vitro* com LPS [172] e camundongos desafiados com LPS *in vivo* [173], no presente modelo de CLP não foram encontradas diferenças dos conteúdos plasmáticos de nitrito e nitrato entre os camundongos do tipo selvagem e os PARP^{-/-}. Por outro lado, as concentrações plasmáticas de TNF foram reduzidas na ausência da PARP tanto no modelo de injeção de LPS como no de CLP. Estes dados

levantam a idéia que a regulação dos mediadores inflamatórios pela PARP são múltiplos.

Papel da PARP no desenvolvimento de falência de múltiplos órgãos associada a sepse

A partir dos dados deste estudo emerge a observação sobre o maior acúmulo de PMNs no pulmão e intestino (avaliado pela atividade de MPO) de animais PARP^{+/+}, enquanto os animais PARP^{-/-} demonstraram estar parcialmente protegidos deste fenômeno (Fig. IV.5). Dados prévios mostraram que a inativação genética da PARP foi associada a menor expressão de selectina nos modelos de isquemia e reperfusão [181]. Em adição, tem sido proposto que a ativação de PMN, seguido de seu recrutamento em vários órgãos, em especial o pulmão, foi desencadeado por fatores contidos na linfa mesentérica [182, 183], isto sugere uma ligação relevante entre disfunção intestinal, ativação de PMN, e disfunção de órgãos à distância no choque. Inflamação pulmonar complicando o curso da sepse tem sido também associada com o aumento da produção de IL-6 [184]. Em particular, IL-6 é importante para o recrutamento de PMN nos tecidos por induzir IL-8, uma quimocina. Desta forma é interessante observar que houve maior aumento da produção de IL-6 nos camundongos selvagens quando comparados com os PARP^{-/-}, indicando que os efeitos benéficos da supressão da PARP, sobre o recrutamento de PMN para os pulmões, pode estar relacionado a modulação através da IL-6 sobre a cascata de sinalização. Nossa hipótese para a redução da inflamação e lesão a órgãos, demonstrada por menor quantidade de MPO

tecidual nos animais PARP^{-/-} decorre de uma menor produção de substâncias quimiotáticas nestes animais quando submetidos a CLP. Dados recentes demonstram que animais tratados com potentes inibidores de PARP, assim como PARP^{-/-}, produzem menos MIP-1 α e MIP-2 no modelo murino de síndrome do desconforto respiratório agudo por instilação intratraqueal de LPS [185].

Falência de múltiplos órgãos e sistemas representa evolução comum da sepse, que pode culminar em óbito. Apresentamos dados sobre animais PARP^{-/-} submetidos a CLP com marcada redução da infiltração por neutrófilos no intestino e pulmão (importantes órgãos alvos na sepse para o desenvolvimento de falência de múltiplos órgãos). As dosagens de AST e BUN plasmáticos indicam menor lesão de fígado e rim nos animais PARP^{-/-} submetidos a CLP. É digno de nota que muitas das diferenças vistas no soro entre os animais PARP^{-/-} e PARP^{+/+} foram relativamente pequenas, e não está claro se estas diferenças se traduzem em melhora de órgãos com significância clínica. Por outro lado não se encontra sempre uma perfeita correlação entre os diversos parâmetros estudados, por exemplo, houve um aumento de MPO e AST nos tempos de 12 e 24 horas, que, entretanto, não se acompanhou por um padrão similar de TBARS. Nos animais PARP^{-/-} ocorreu uma proteção precoce contra a injúria hepática (Tabela IV.1), que foi também associada com redução de MPO em 12 horas (Fig. IV.5). Entretanto, em 24 horas, as concentrações de MPO foram similares em ambos os grupos e houve quantidades semelhantes de

AST em 12 e 24 horas pós CLP. Portanto, é possível que a ausência da PARP proteja contra a agressão hepática inicial, porém não se mostrou eficiente nos períodos mais tardios estudados.

A falência circulatória é outra causa final comum de morte na sepse. A ativação da PARP no choque endotóxico associa-se a reduzidas contração e relaxamento vascular [109], condição que compromete a capacidade de regulação do fluxo sanguíneo para os órgãos. A seqüência possível de eventos é que os animais PARP^{-/-} tenham reduzida produção de citocinas pro-inflamatórias com conseqüente menor inflamação e dano a órgãos, e proteção do sistema vascular.

IV.II. PAPEL DA POLI (ADP-RIBOSE) POLIMERASE NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL INDUZIDA PELA HIPERGLICEMIA

A maioria de óbitos em UTI que ocorrem após os primeiros dias da internação são atribuíveis à falência de múltiplos órgãos e sistemas e sepse. O aumento da suscetibilidade a complicações infecciosas, funcionais ou estruturais é decorrente de uma resposta inflamatória sistêmica e injúria celular [14, 15]. Diversas linhas de evidências sustentam o conceito que distúrbios do metabolismo energético contribuem para a falência de órgãos [14, 15]. Isto foi imputado originalmente e exclusivamente a inadequada perfusão tecidual e hipóxia celular. Entretanto, estudos recentes apontam para um distúrbio na utilização do oxigênio antes do que para a oferta de oxigênio, o qual tem sido denominado hipóxia citopática [14, 15].

Atualmente, está bem estabelecido que patologias ou injúrias agudas resultam em resistência a insulina, intolerância a glicose, e hiperglicemia, esta constelação de fatos é denominada “diabetes da injúria” [15]. Doença crítica ou o trauma aumentam a neoglicogênese hepática a despeito da hiperglicemia e abundante síntese e liberação de insulina. Resistência hepática à insulina é caracterizada por quantidades plasmáticas de proteína ligadora de IGF (IGF-binding protein-1: IGFBP-1) elevadas [186-190]. Esta redução de captação de

glicose dependente da ação de insulina, também foi demonstrada no coração e músculo esquelético [14, 15]. Entretanto, no aspecto global, a captação de glicose em pacientes críticos está aumentada às custas de tecidos que não dependem da insulina, como por exemplo, o sistema nervoso central e células sangüíneas [14, 15]. Os casos mais graves de hiperglicemia induzida pelo estresse e mais elevadas concentrações de IGFBP-1 são observadas em pacientes com o maior risco para óbito [14, 15]. A resposta hormonal contra-regulatória, liberação de citocinas, e controle do sistema nervoso, em conjunto atuam ou afetam as vias do metabolismo de glicose, conduzindo ao diabetes da injúria [14, 15]. Os hormônios envolvidos incluem catecolaminas, cortisol, glucagon, e hormônio do crescimento (GH). Citocinas pro-inflamatórias afetam indiretamente a homeostase da glicose, em decorrência do estímulo a secreção de hormônios contra-regulatórios, e diretamente, por alterar os receptores de sinalização a insulina. Há dados de envolvimento da geração de SOCS-1 e SOCS-3 nas vias de sinalização da insulina por receptores. Na verdade, a geração de SOCS-3 estimulada por IL-6 tem se demonstrado inibir a ação da insulina sobre o receptor produzindo fosforilação de tirosina e toda a sinalização a partir deste ponto, tanto SOCS-1 quanto SOCS-3 tem sido demonstradas em degradar o substrato do receptor de insulina (IRS-1) e IRS-2 [14, 15]. Além disso, demonstrou-se que catecolaminas endógenas e exógenas prontamente inibem a secreção de insulina pelas células β , e tanto catecolaminas quanto angiotensina II exercem efeitos anti-insulina. Anormalidades na sinalização de insulina tem sido descritas em modelos de

ratos, simulando a doença crítica resultante de prolongada administração de endotoxina em dose não letal e concomitante jejum, o que mimetiza parcialmente a condição de sepse humana [14, 15]. No fígado há abundância de fosforilação de tirosina do receptor de insulina, enquanto IRS-1 e IRS-2 estão reduzidas em sua quantidade. Além disso, houve reduzida associação de PI3K com IRS-1. No músculo esquelético, alterações semelhantes foram observadas, exceto pelo fato que o número de receptores de insulina e IRS foram normais.

Episódios hiperglicêmicos são responsáveis pelo desenvolvimento de disfunção endotelial, que representa um fator precoce precedendo as alterações vasculares estruturais [191-195]. Disfunção e dano endotelial têm sido implicados na deposição de plaquetas e neutrófilos, vasoespasmos, episódios isquêmicos e aterosclerose [191, 192]. Neste trabalho investigamos se a perda de função endotelial na hiperglicemia e diabetes é dependente da ativação da via da PARP nos tecidos que compõem os vasos.

Completa destruição das ilhotas pancreáticas foi induzida pela administração de altas doses de estreptozotocina em camundongos. A perda da secreção de insulina desencadeou grave hiperglicemia pelo período de 8 semanas dos experimentos (Fig. IV.II.1a). Encontramos intensa marcação para nitrotirosina (um indicador da produção de espécies reativas de nitrogênio [196], aumento de quebra de DNA e ativação da PARP nos vasos dos animais submetidos à hiperglicemia (Fig. IV.II.2).

Fig. IV.II.1 Reversão da disfunção endotelial induzida por hiperglicemia com a inibição da PARP.

Símbolos usados pelos respectivos grupos: animais que não receberam estreptozotocina (Δ), animais não diabéticos controle após 8 semanas tratados com PJ34 entre as semanas de 1 a 8 ($\blacktriangle$), animais diabéticos de 8 semanas tratados com o veículo ($\circ$), animais diabéticos de 8 semanas tratados com PJ34 entre as

semanas de 1 a 8 (●). **a**, Concentrações sanguíneas de glicose, conteúdo pancreático de insulina (ng insulina/mg de proteína pancreática) e quantidade de hemoglobina glicosilada (gHb) (expressa com o % da Hb total) em 0 e 8 semanas de animais diabéticos, controles e tratados com PJ34. O início do tratamento com inibidor da PARP, começando na semana 1 após a estreptozotocina e continuando até o final da oitava semana, é indicado pela seta. Os conteúdos de insulina pancreática e hemoglobina glicosilada são mostrados na oitava semana dos animais tratados com veículo ou estreptozotocina, na presença ou ausência de tratamento por PJ34. **b**, Relaxamento endotélio dependente induzido por acetilcolina. Contração induzida por fenilefrina, e relaxamento induzido por nitroprussiato. *, $P < 0.05$ para diabéticos tratados com veículo versus diabéticos tratados com PJ34 ($n = 8$ por grupo).

Fig. IV.II.2 Geração de espécies reativas de nitrogênio, quebras de ssDNA e ativação de PARP em vasos sanguíneos de animais diabético. **a–c**, Marcação por imunohistoquímica para nitrotirosina em anéis de aorta controle (**a**),

em anéis de camundongos diabéticos tratados com o veículo na oitava semana (**b**), e anéis de aorta de camundongos diabéticos tratados com PJ34 (**c**). **d–f**, A indicação de quebra da fita de DNA foi realizada pela marcação com dUTP marcado na ponta final através da enzima deoxirribonucleotidil terminal transferase, nos anéis controle (**d**), nos anéis de camundongos diabéticos por 8 semanas tratados com veículo (**e**), e em anéis de camundongos diabéticos tratados com PJ34 (**f**). **g–i** Marcação por imunohistoquímica para a presença de poli(ADP-ribose), um indicador da ativação da PARP, em anéis controle (**g**), em anéis de camundongos diabéticos por 8 semanas tratados com veículo (**h**), e em anéis de camundongos diabéticos tratados com PJ34 (**i**). Perfis de marcação imunohistoquímica semelhantes foram vistos em $n = 4–5$ anéis vasculares por grupo.

Experimentos *ex vivo* demonstraram perda de função endotelial nos camundongos que receberam estreptozotocina, avaliado pelo relaxamento dos anéis de aorta a vasodilatadores endotélio dependente, a acetilcolina um hormônio indutor da secreção de óxido nítrico (NO) [49, 197] (Fig. IV.II.1). O tratamento crônico com PJ34 um inibidor da ativação de PARP, foi iniciado uma semana após a destruição das ilhotas pancreáticas. Este tratamento apesar de iniciar-se após a hiperglicemia foi capaz de prevenir a ativação vascular da PARP (Fig. IV.II.2) e restaurou a função vascular normal (Fig. IV.II.1b), sem, contudo ter alterado as altas concentrações de glicose sistêmicas, a hemoglobina glicosilada ou o conteúdo pancreático de insulina (Fig. IV.II.1a). A resposta de relaxamento não dependente do endotélio a nitroprussiato de sódio (SNP) não foi alterada (Fig. IV.II.1), indicando que a habilidade do endotélio para sintetizar e liberar NO está comprometida no diabetes, antes do que a habilidade do músculo liso para relaxar em resposta a NO. A redução da resposta contrátil da aorta torácica nos animais diabéticos foi também melhorada pela inibição da PARP (Fig. IV.II.1b). Medimos os subprodutos de óxido nítrico no plasma (nitrito/nitrato). Houve pequena mas significativa elevação dos conteúdos plasmáticos de nitrito/nitrato nos animais hiperglicêmicos (de 21 ± 2 a 31 ± 3 μM em 8 semanas; $P < 0,05$; $n = 8$ por grupo). Em contraste, nitrito/nitrato não apresentou alterações durante diabetes

nos animais tratados com PJ34 ($23 \pm 2 \mu\text{M}$ no início do estudo e $21 \pm 1 \mu\text{M}$ em 8 semanas de diabetes; $n = 8$ por grupo).

Altas concentrações de glicose induziram ativação da PARP *in vitro*

Células endoteliais pulmonares geradas a partir de camundongos selvagens e PARP^{-/-} foram cultivadas em meio com elevada glicose ou em meio com controle osmótico e concentração de glicose normal. Altas concentrações de glicose induziram quebra de uma hélice de DNA (ssDNA) de forma dependente do tempo, e também ativação da PARP (Fig. IV.II.3a e b). O grau de quebra de ssDNA foi similar entre as células do tipo selvagem e PARP^{-/-} (Fig. IV.II.3a). A glicose elevada induziu ativação da PARP nas células endoteliais de camundongo e em células endoteliais de cordão umbilical humano, e esta ativação foi abolida pelo tratamento com PJ34 (Fig. IV.II.3c e d). Um discreto aumento de ativação da PARP (36% acima do controle em 6 h de incubação com glicose) foi, contudo observado em células endoteliais PARP^{-/-} (Fig. IV.II.3b), que pode ser relacionado à atividade de várias isoformas menores de PARP. Controles osmóticos (L-glicose 30 mM) se mostraram com valores iguais aos controles com glicose normal nos estudos *in vitro*. A ativação da PARP em resposta a glicose elevada foi atenuada pela presença de superóxido dismutase (SOD), de MnTBAP mimetizadora de superóxido dismutase solúvel, a combinação de SOD e catalase, e carboxi-PTIO (um composto seqüestrador de NO) indicando que a ativação da PARP é relacionada à geração intravascular de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Fig. IV.II.3c). De

forma semelhante, a inibição farmacológica pelo NG-metil-L-arginina (L-NMA) ou NG-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME)—mas não pela aminoguanidina, um inibidor da NO sintetase induzível—reduziu o grau de ativação da PARP nas células endoteliais expostas a altas concentrações de glicose (Fig. IV.II.3c). Assim como os estudos *in vivo*, nitração da tirosina foi detectada nas células endoteliais expostas a alta glicose (Fig. IV.II.3). A imuno-marcação para nitrotirosina nas células endoteliais submetidas à elevada concentração de glicose mostrou localização preferencial em região perinuclear (Fig. IV.II.3e).

Fig. IV.II.3 Geração de espécies reativas de nitrogênio, quebras de ssDNA e ativação de PARP em células endoteliais cultivadas em alta concentração de glicose. **a**, Evolução temporal de quebra de ssDNA (SSB, porcentagem do DNA total) em animais selvagens (■) e células endoteliais PARP-/- (□). **b**, Evolução temporal da ativação da PARP em células de animais selvagens (■) e células endoteliais PARP-/- (□) expostas a glicose 30 mM, quando comparadas a atividade em meio de cultura normal, valores expressos como NAD^+ consumido / minuto / mg proteína. **c**, O efeito de: L-NMA, L-NAME, aminoguanidina (AG), SOD, catalase (CAT), a combinação de 2,500 U/ml SOD e 4,000 U/ml CAT, os miméticos de SOD [manganês(III) tetraquis(ácido benzóico)cloreto de porfirina (MnTBAP), o sequestrador de NO 2-(4-carboxifenil)-4, 4,5,5-tetrametilimidazolina- 1-oxil 3-oxide (c-PTIO) e PJ34 sobre a ativação da PARP por alta concentração de glicose. **d**, Ativação da PARP em resposta a glicose 30 mM, quando comparada com a atividade em meio de cultura com concentrações fisiológicas de glicose, em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), e o efeito de PJ34. *, $P < 0,05$ indica significativa inibição da ativação da PARP por intervenções independentes ($n = 6-8$ por grupo). **e**, Nitração de tirosina em células endoteliais mantidas em meio de cultura normal (esquerda) e em células expostas a altas concentrações de glicose (direita). Perfis de marcação por imunohistoquímica semelhantes foram observados em $n = 4-5$ experimentos independentes.

Altas concentrações de glicose induziram disfunção endotelial dependente da PARP Semelhante aos estudos *in vivo* de hiperglicemia e diabetes, incubação da aorta torácica de animais selvagens em meio contendo altas concentrações de glicose resultou em perda substancial da função de relaxamento vascular endotélio dependente. Em contraste, anéis vasculares de camundongos PARP^{-/-} foram completamente resistentes ao desenvolvimento de disfunção endotelial induzida por elevada glicose (Fig IV.II.4). A inibição da PARP também protegeu do desenvolvimento de disfunção endotelial induzida pela glicose (Fig. IV.II.4).

Fig. IV.II.4 Anéis vasculares de animais PARP^{-/-} são resistentes à perda de função endotelial induzida por alta concentração de glicose. Anéis incubados com glicose 30 mM por 16 horas (“*Glicose elevada*”) exibiram um bloqueio do relaxamento dependente de endotélio. Este efeito não foi visto em anéis de camundongos PARP^{-/-}, e foi prevenido pela co-incubação dos anéis de camundongos selvagens com PJ34 (3 μ M) (“*Glicose elevada + PARP inibidor*”). O controle osmótico (30 mM L-glicose) não alterou

o relaxamento vascular endotélio dependente (dados não apresentados). *, $P < 0,05$ indica significante diferença entre os grupos conforme indicado ($n = 5-6$ por grupo). PARP +/+, ○, controle; ●, glicose elevada; ▲, glicose elevada +PARP inibidor. PARP -/-, ○, controle; ●, glicose elevada.

A ativação da PARP é conhecida por deflagrar um ciclo intracelular de gasto de energia que leva à depleção dos conteúdos celulares de NAD^+ e fosfatos de alta energia. No intuito de verificar a relevância deste mecanismo para a disfunção celular induzida por elevadas concentrações de glicose, dosamos as concentrações celulares de nucleotídeos de piridina nas células endoteliais expostas a altas concentrações de glicose. Observamos importante supressão das quantidades de fosfatos de alta energia, como também de NAD^+ e NADPH nas células endoteliais expostas a altas concentrações de glicose por 24 horas (Tabela IV.II.1). Estes efeitos foram prevenidos pela inibição farmacológica da PARP ou pelo fenótipo $\text{PARP}^{-/-}$ (Tabela IV.II.1). Houve significante, redução da atividade de NO sintetase endotelial (eNOS) dependente da ação da PARP nas células expostas à elevada glicose (Tabela IV.II.1). Perda da função celular relacionada à atividade da PARP (avaliado pela incorporação de amino ácidos para as células endoteliais) foi também observada (Tabela IV.II.1).

Tabela IV.II.

	Controle	PARP ^{+/+} alta glicose	+ PJ34 alta glicose	PARP ^{-/-} alta glicose
NAD⁺	99.1 ± 3.9	48.4 ± 1.9 ^a	76.7 ± 2.3 ^b	121.3 ± 10.8 ^b
NADH	6.9 ± 1.8	5.0 ± 0.1	5.6 ± 1.4	5.9 ± 1.6
NADP⁺	39.7 ± 1.5	20.6 ± 1.2 ^a	37.1 ± 2.8 ^b	32.4 ± 1.7 ^b
NADPH	2.1 ± 0.2	0.8 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.1 ^b	1.8 ± 0.1 ^b
ATP	466.1 ± 15.7	282.5 ± 13.6 ^a	420.1 ± 36.7 ^b	409.4 ± 9.3 ^b
ADP	54.7 ± 4.1	58.3 ± 3.0	62.7 ± 1.9	55.5 ± 3.8
AMP	42.2 ± 9.9	50.7 ± 7.0	42.5 ± 3.9	25.1 ± 3.5
eNOS ativ.	54.2 ± 3.3	32.3 ± 3.0 ^a	58.1 ± 5.6 ^b	50.6 ± 5.0 ^b
Função cel.	100.0	89 ± 2.0	101 ± 2.0	102 ± 2.0

Altas concentrações de glicose induziram ativação de NF-κB decorrente da ação da PARP. A enzima PARP tem sido implicada na ativação do fator de transcrição nuclear κB (NF-κB), e na expressão dos genes pro-inflamatórios que são dependentes deste fator de transcrição [173]. Portanto, realizamos dosagens de NF-κB ativado nas células endoteliais de fenótipo selvagem e de PARP^{-/-}. Altas concentrações de glicose causaram aumento de ativação do NF-βB nas células selvagens, e uma ativação de menor monta nas células PARP^{-/-}. As células PARP^{-/-} apresentavam menor grau de ativação NF-κB em condições basais comparadas às células do tipo selvagem. Em contraste às células

PARP^{-/-}, a inibição farmacológica da PARP não afetou o grau de ativação de NF-κB (Fig. IV.II.5).

Fig. IV.II.5 Análise do efeito da PARP sob a ativação de NF-κB por EMSA. Células endoteliais selvagens (+/+) e PARP^{-/-} (-/-) foram incubadas cultivadas por 2 horas em meio contendo alta concentração de glicose, seguido por extração dos núcleos para análise por EMSA. O complexo do NF-κB está indicado pela seta. A concentração de glicose elevada causou um aumento pronunciado na ativação de NF-κB em células de animais selvagens, e um menor grau de ativação em células PARP^{-/-}. Células PARP^{-/-} exibiram um menor ativação de NF-κB em situação de glicose normal, comparando-s às células de animais selvagens. Inibição farmacológica da PARP com PJ34 (3mM) não afetou o grau de ativação de NF-κB.

Várias isoformas e de formas clivadas alternativas da enzima PARP com atividade de poli(ADP-)ribosilação existem [198, 199]. A isoforma previamente denominada “PARP”, e que está faltando nos animais PARP^{-/-} usados no presente estudo é agora conhecida como PARP-1. Nossos estudos

identificaram a ativação da PARP-1 como uma nova via da vasculopatia diabética, decorrente da hiperglicemia. Demonstramos que tanto *in vitro* e *in vivo* a disfunção da célula endotelial em resposta a altas concentrações de glicose está associada com aumento da poli(ADP) ribosilação. Além disso, a função endotelial é mantida nos vasos de animais nos quais a PARP-1 está inativada ou a PARP está inibida farmacologicamente.

Peróxido de hidrogênio, anion superóxido e peroxinitrito são indutores endógenos da ssDNA, que é o deflagrador da ativação da PARP [109, 166, 200]. Há dados de que o endotélio vascular é sensível à produção de oxidantes induzidos por altas concentrações de glicose e relacionado à disfunção celular. Estudos prévios têm demonstrado a geração de H_2O_2 no endotélio diabético, e a geração de radicais livres de oxigênio (principalmente na mitocôndria) nas células endoteliais expostas a altas concentrações de glicose [195, 201-205]. Células endoteliais expressam de forma constitutiva a isoforma de NOS endotelial (eNOS), que produz NO para condições fisiológicas. Em condições de estresse oxidativo, O NO derivado do endotélio pode reagir com o anion superóxido formando o peroxinitrito, um potente oxidante. Fundamentados no efeito inibitório, sobre a ativação da PARP induzida por altas concentrações de glicose, provido pela superóxido dismutase, seus miméticos, inibidores de NOS, e seqüestradores de NO, propomos que as espécies reativas de oxigênio, como os radicais de hidroxila, e espécies reativas de nitrogênio, tais como peroxinitrito, são os prováveis ativadores da PARP no endotélio submetido à hiperglicemia (Fig. IV.II.6). O óxido nítrico, necessário para a

formação de nitrotirosina, é produzido por fontes constitutivas em nosso modelo *in vitro*. Por outro lado, nos modelos de hiperglicemia *in vivo*, as concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato refletem uma elevação da regulação basal de produção NO, decorrente de aumento de ação da eNOS [205] ou indução da isoforma induzível da NOS (iNOS) [206]. Nitração da tirosina pode afetar de forma adversa vários processos metabólicos celulares e de sinalização [196], e pode contribuir diretamente para o desenvolvimento de disfunção endotelial associado à hiperglicemia e diabetes. Apesar da nitrotirosina ter sido considerada inicialmente um marcador específico da geração de peroxinitrito, há outras vias de nitração da tirosina [207]. Portanto, nitrotirosina é atualmente considerada um índice coletivo de espécies reativas de nitrogênio, e não mais um indicador específico da formação de peroxinitrito [196, 207].

Qual, então, é o mecanismo celular mediado pela PARP, da disfunção endotelial da hiperglicemia? Estudos prévios mostraram que a exposição de células endoteliais expostas a oxidantes produziu um estado crítico no metabolismo energético da célula, que é prevenido pela inibição da PARP [109]. Nossos dados suportam isto por demonstrar que concentrações elevadas de glicose induzem significativa, alterações nos conteúdos endoteliais de ATP e nucleotídeos de piridina (inclusive NADPH). A eNOS é uma enzima que tem como cofator o NADPH [49], a depleção do NADPH nas células endoteliais expostas a altas concentrações de glicose é diretamente responsável pela inibição da atividade de eNOS e a supressão seletiva da

vasodilatação dependente do endotélio em vasos sangüíneos diabéticos (Fig. IV.II.6).

Estudos prévios implicam a PARP nos processos de expressão de genes pro-inflamatórios [172, 173, 181]. Em macrófagos de animais PARP^{-/-}, há uma redução na ativação de NF- κ B, com supressão subsequente da expressão de genes pro-inflamatórios [181]. A expressão de ICAM-1 [172], TNF- α [181] e iNOS [173] são suprimidas em células de animais PARP^{-/-}. A ativação de NF- κ B, e a produção de ICAM-1, TNF- α e iNOS têm sido implicados na patogênese da disfunção endotelial do diabetes [195, 206, 208-210]. *In vivo* a ausência da PARP e conseqüente supressão de vários mecanismos pro-inflamatórios pode, portanto constituir um modo adicional de proteção à disfunção vascular do diabetes (Fig. IV.II.6). Em contraste à situação de células PARP^{-/-}, a inibição farmacológica da PARP mostrou-se não suprimir a ativação do NF- κ B em resposta as altas concentrações de glicose *in vitro*. Estes dados, em concordância com os achados prévios [181], indicam que a presença de PARP (por exemplo, através da associação física da PARP com proteínas nucleares), e não a atividade catalítica da PARP seja o regulador primário da ativação do fator de transcrição.

A ativação da PARP tem sido implicada na patogênese da destruição das ilhotas de Langherans no diabetes tipo I [211, 212]. Desta forma nós iniciamos o tratamento com inibidor da PARP após a destruição de ilhotas ter sido estabelecida e a hiperglicemia estabilizada, modelando um estado avançado de diabetes. Nossos estudos, portanto, apresentam o

desenvolvimento de disfunção vascular associada à hiperglicemia, como visto nas situações de diabetes tipo I e II. Nosso trabalho mostra que a via da PARP intra-endotelial local está associada na patogênese da disfunção endotelial do diabetes.

V – ESTUDO DOS EFEITOS DE INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA AO LPS

(Referente aos estudos do Projeto FAPESP 02/07430-6, sobre “Alterações de expressão gênica na sepse e tolerância a LPS: análise da participação do óxido nítrico na regulação gênica da sepse” dos alunos de pós-graduação : Tatiana Goloubkova, Ediele Sant’Ánna de Melo e Denise Frediane Barbeiro)

Efeito da indução de tolerância ao LPS nas populações linfocitárias e alteração da expressão gênica

A resistência ao LPS pode ser adquirida ou geneticamente determinada. Animais de experimentação, submetidos à prévia exposição de LPS em doses sub-letais desenvolvem um estado de resistência adquirida, protegendo-os da ação de doses letais, e dos efeitos pirogênicos e metabólicos de LPS. O fenômeno de redução da mortalidade associada com LPS, ou a então chamada tolerância a endotoxina, não é específico à ação de LPS e apresenta reação cruzada com outros estímulos, tais como, peptidoglicano, lipoproteína das bactérias, estresse hipertérmico, lipoaribinomanam, ácido lipoteicoico, micobacterium, muramil dipeptídeo, 25-hidroxi-colesterol, estresse cirúrgico, isquemia, TNF e IL-10 [213, 214]. A tolerância pode ser detectada dentro das primeiras 24 horas depois de exposição ao LPS e perdura de 8 a 30 dias. A tolerância ao LPS relaciona-se à produção e liberação reduzidas de citocinas pelos fagócitos em re-exposição ao LPS. Além disso, foi demonstrado que a exposição prévia ao LPS resulta em alteração de padrão de expressão gênica das citocinas (Ilustração V. 1) [215]. Há dados de que a tolerância a endotoxina resulta de alterações em rotas de transdução de sinal induzidas pelo LPS. Inicialmente foi proposto que a tolerância seria uma resposta imunológica benéfica, entretanto as evidências indiretas sugerem-na como um marcador ou participante de desregulação imunológica, complicando o manejo de pacientes em sepse severa.

Ilustração V.1 – Representação das alterações na sinalização intracelular induzidas pela tolerância ao LPS.

Expressão gênica e sepse

Os avanços recentes em biotecnologia, os resultados de sequenciamento do genoma humano e o desenvolvimento de métodos de análise da expressão gênica em escala genômica oferecem oportunidades para melhorar nosso conhecimento de mecanismos de alta complexidade, tais como a fisiopatologia de doenças. Tem sido proposto que todas as células envolvidas em resposta imunológica específica atuam de maneira coordenada e dividem elementos regulatórios comuns. A sepse é o resultado da ativação de um número grande de genes que interagem em redes complexas. Este processo coordenado cria uma área de citocinas caracterizada pela produção de um único padrão de citocinas ou quimocinas e receptores deles correspondentes (“assinatura da expressão gênica”). O uso de padrões de expressão gênica, coletados em sistemas experimentais bem definidos, pode indicar a regulação de rotas celulares e as funções fisiológicas dos genes envolvidos em resposta celular particular do hospedeiro. O princípio de análise em macro-unidades de matrizes (“macroarray analysis” Ilustração V.2) é a quantificação paralela dos níveis de mRNA de milhares de genes. Na maioria dos casos, dois exemplos de mRNA são comparados diretamente em duas membranas simultâneas com sondas de cDNA, marcados com fósforo radioativo, derivados das amostras. A extensão de hibridização das sondas com cada gene na macro-unidade é quantificada e a razão de intensidades para cada banda reflete a expressão gênica relativa em cada amostra de mRNA. Assim, a estratégia de complementação da investigação de um único

gene com estudos genômicos parece ser promissor e já foi utilizado em identificação de padrões fisiológicos da expressão gênica em fisiopatologia de sistema imunológico, traumatismo, choque hemorrágico, neoplasias, doenças auto-imunes [216].

Ilustração V.2 – Imagem da membrana de nylon utilizada no macroarray.

O conhecimento da expressão gênica dos fatores moduladores da sepse pode contribuir para a compreensão da defesa do organismo contra as bactérias, as vias de ação dos sistemas imunológicos inato e adaptativo com desenvolvimento de testes diagnósticos indicadores de resposta inflamatória aguda e orientação para agente terapêutico específico.

Estudaremos as alterações de populações linfocitárias através de análise de citometria de fluxo. A seguir estudaremos as alterações gênicas e suas implicações no processo de tolerância a LPS nas células linfocitárias. Os linfócitos estão diretamente envolvidos na resposta a sepsE, e pela sua vida média e características celulares podem estar envolvidas nesta resposta de tolerância que pode perdurar até 30 dias.

Estabelecimento do modelo de tolerância ao LPS.

Como se tratava da primeira vez que trabalhávamos com o modelo de tolerância, verificamos os parâmetros classicamente descritos que se alteram e caracterizam que os animais estão tolerantes.

A confirmação da indução de tolerância foi definitivamente demonstrada pelos estudos de mortalidade por altas doses de LPS (Figura V.1). Esses estudos mostraram que os animais expostos previamente a pequenas doses de LPS, tiveram menor índice de mortalidade comparados ao grupo controle, quando foi administrada uma dose letal de LPS. Pudemos constatar também que este fenômeno, redução da mortalidade, depende da dose prévia. Estudamos duas doses para indução de tolerância (0,5 mg/kg e 1,0 mg/kg) e constatamos que a dose maior (1,0mg/kg) produziu proteção total sob a mortalidade, tanto quando utilizamos dose letal de 20 como a de 40 mg/kg.

Figura V.1 – Estudo de mortalidade pelo desafio com dose letal de LPS (20 ou 40 mg/Kg i.p.). Comparação entre animais controle (losango), tolerantes baixa dose (LPS 0,5 mg/Kg) e tolerantes alta dose (1,0 mg/Kg). Fig. V.1A. os animais receberam dose letal de 20 mg/Kg, e Fig. V.1B. os animais receberam dose letal de 40 mg/Kg.

A seguir dosamos as citocinas (TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-10 e MIP-2) e também dosamos as concentrações séricas de óxido nítrico em animais controle e animais tolerantes. Observamos que a administração de uma dose letal de LPS era seguida por elevação das concentrações de TNF, IL-6, IL-10 e MIP-2 em todos os animais (Figura V.2).

Figura V.2 – Dosagens de citocinas TNF, IL-6, IL-10, IL-1 e quimocina MIP-2 em animais controle (losango cheio) e tolerantes (quadrado vazio).

Contudo, os animais tolerantes apresentaram intensa redução nas quantidades de TNF, IL-1, IL-6 e MIP-2, comportamento característico do animal tolerante. A IL-10, no entanto, não apresentou alteração na sua produção em decorrência da indução de tolerância e perante desafio com o próprio LPS. Estes dados confirmam que desenvolvemos adequadamente o modelo desejado. A literatura apresenta algumas controvérsias em relação a algumas citocinas, este é mais um motivo da necessidade de reproduzirmos estes experimentos, e termos o nosso padrão de resposta de citocinas no modelo de tolerância. Há relatos conflitantes sobre maior produção ou redução de IL-1 em animais tolerantes a LPS [217-220]. Podemos observar que há primordialmente uma redução de citocinas que desempenham papel ativador da resposta inflamatória pela tolerância sem, contudo reduzir a citocina anti-

inflamatória. O balanço final desta ação é um padrão de resposta a toxinas e produtos bacterianos com menor grau de resposta inflamatória.

Dosagens das concentrações de óxido nítrico.

A produção de óxido nítrico (NO) e sua quantidade plasmática é determinada basicamente pela atividade das óxido nítrico sintetase constitutiva (endotelial, músculo liso) e induzível (iNOS) (macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e músculo liso). A expressão da iNOS depende de ativação das vias de sinalização intracelular que passam pelo NF- κ B, a mesma via que induz a produção de citocinas. O resultado que se esperaria é uma redução da produção de NO em animais tolerantes em relação aos controles, contudo nossos dados não mostraram diferença na produção de NO entre os dois grupos estudados, após o desafio com LPS em altas doses (Figura V.3). O comportamento da produção de NO é semelhante ao que ocorreu com a IL-10, isto levanta a hipótese de haver diferenças nas vias intracelulares de indução das citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, assim como do NO. Talvez haja semelhança nas vias de indução de IL-10 e NO.

Figura V.3 – Dosagem dos produtos do óxido nítrico, nitrito e nitrato, em plasma de camundongos controle (losango cheio) e tolerantes (quadrado vazio).

Resposta inflamatória dos animais tolerantes perante a ligadura e punção cecal (CLP).

Este modelo de sepsE é com bactérias vivas e polimicrobiano, havendo, portanto a estimulação de diversos receptores Toll simultaneamente, como pode ocorrer em infecções de pacientes. Como se trata de bactérias vivas também a sua multiplicação, atividade para se manterem vivas produzindo diversas toxinas e invasão tecidual são reproduzidas neste modelo. A CLP representa um modelo experimental significativo em reproduzir a sepsE que encontramos nos pacientes, podendo apresentar respostas diferentes ao encontrado com LPS. Desta forma poderemos avaliar: 1- se o padrão de resposta de animais tolerantes se mantém frente à infecção bacteriana; 2- se a tolerância é um processo de sobreposição das vias de sinalização entre os diferentes receptores Toll; 3- a relevância de indução de tolerância perante infecções bacterianas (se reduz ou aumenta a mortalidade). As dosagens de citocinas mostraram novamente elevação de suas concentrações em todos os animais submetidos a CLP (Figura V.4). Sendo que as citocinas proinflamatórias mostraram-se em menor concentração plasmática nos animais tolerantes, como quando desafiados com doses letais. Por outro lado a IL-10 neste modelo de sepsE polimicrobiana, apresentou se significativamente reduzida nos animais tolerantes submetidos a uma CLP mais grave, em comparação aos animais controle. Portanto, a citocina IL-10 apresenta um padrão de resposta na CLP diferente ao observado com doses letais de LPS. Enquanto a IL-6, reduziu-se comparativamente entre CLP de 1

para a CLP de 2 furos nos animais controle. Aliando todos estes dados, parece haver no animal controle submetido a modelo de sepse mais grave um predomínio da resposta anti-inflamatória, o que pode predispor a incapacidade de eliminação inadequada das bactérias do foco infecciosos. A IL-10 pode inibir a migração de neutrófilos para o local de infecção, e inibir a capacidade de fagocitose dos neutrófilos e macrófagos. Por outro lado, apesar dos animais tolerantes continuarem a apresentar menor produção de citocinas pro-inflamatórias, no desafio bacteriano estes animais também produzem menor quantidade de IL-10, assim o balanço final das citocinas pode ser favorável em termos de menor inflamação e auto-agressão e menor inibição da ação de neutrófilos pela IL-10.

Figura V.4 – Dosagens de citocinas plasmáticas em animais submetidos a CLP, comparando-se grupo controle e grupo tolerante. A CLP foi de dois graus de gravidade com 1 furo ou com 2 furos.

A dosagem de NO plasmático mostra padrão de resposta diferente, ou seja, os animais tolerantes têm maiores concentrações de NO, e quanto mais grave a sepse maior a concentração (Figura V.5). Este dado continua evidenciando que a indução da tolerância, altera partes específicas das vias de sinalização, ou altera de forma diferente estas vias. A IL-10 e NO não mais apresentam comportamento semelhante, como ocorreu com o desafio de LPS, porém houve até uma inversão, pois o NO aumenta enquanto a IL-10 diminui no animal tolerante. A alteração de produção de citocinas induzida pela tolerância talvez não decorra de mudanças nas vias de sinalização ou só de alterações nestas vias, há dados na literatura mostrando modificações na metilação das histonas ao redor da região do promotor de IL-1 [221] .

Figura V.5 – Dosagem dos produtos de óxido nítrico no plasma de animais controle e tolerantes submetidos a CLP de 1 ou 2 furos.

A indução de tolerância a LPS mostrou a capacidade de reduzir a mortalidade dos animais submetidos a CLP menos grave (Figura V.6), este dado mostra que não apenas há uma proteção da resposta

inflamatória “exagerada” como ainda preservou-se a capacidade de eliminação de bactérias e conseqüente cura e aumento de sobrevida.

Figura V.6 – Estudo da mortalidade dos animais controle (losango cheio) e tolerantes (quadrados vazios) submetidos a CLP por 1 furo.

Estudo das células participantes da resposta imunológica.

A capacidade dos neutrófilos atingirem o local de infecção tem sido demonstrado ser um fator determinante da evolução para cura ou morte no modelo de sepse por CLP [222-227]. A tolerância produziu animais que respondem a inflamação e infecção com menores quantidades de citocinas próinflamatórias e quimiocinas, fato que pode reduzir a ativação de endotélio e neutrófilos, reduzindo a infiltração neutrofílica para o local de infecção. A realização de contagem de células no lavado peritoneal destes animais, contudo, mostrou que os animais tolerantes têm maiores quantidade de células na cavidade (Figura V.7). Esta maior resposta neutrofílica ocorreu tanto na sepse moderada como na grave. As quantidades celulares apresentam perfil

inverso ao da IL-10, o que é coerente com as ações desta citocina. Por outro lado, os níveis plasmáticos de NO não guardam correlação com os neutrófilos da cavidade peritoneal. Isto contrasta com dados da literatura [227-229], contudo pode ser que o NO que determina a redução de mobilidade do neutrófilo seja aquele diretamente produzido na parede vascular da microcirculação, assim não tendo sido detectado pela dosagem plasmática. A mortalidade observada e a quantidade de neutrófilos na cavidade dos animais tolerantes explicam e estão em concordância com os dados da literatura. Aparentemente o fator determinante da migração de neutrófilos e mortalidade neste estudo parece ser a quantidade plasmática de IL-10, onde a indução de tolerância atuou.

Análise das células do baço.

O estudo das populações de linfócitos do baço mostra que houve aumento absoluto do número destas células nos animais submetidos a indução de tolerância a LPS (Figura V.8). A população de CD4 não está significativamente elevada, porém as células CD4 apresentaram uma indução generalizada de suas subpopulações. Houve aumento tanto das subpopulações produtoras de citocinas próinflamatórias (INF) como das populações produtoras de citocinas antiinflamatórias. Dentro desta linhagem celular não podemos dizer que há um padrão predominante, mas antes uma ativação ou estimulação genérica. Atualmente está se discutindo se há realmente células que produzam em particular cada tipo de citocina, ou se cada célula pode produzir as diferentes citocinas de forma simultânea. De qualquer forma o que podemos concluir é que os linfócitos CD4 estão pré arregimentados para responderem a infecção.

Figura V.8 – Quantificação das células do baço. Número total de linfócitos comparando-se controle com tolerante. Quantidade de CD4 contendo TNF, INF e IL-10 no intracelular.

Em relação aos monócitos observamos uma elevaçãoem sua quantidade nos animais tolerante, e assim como os linfócitos estes também apresentam aumento de todas as subpopulações produtoras de citocinas (Figura V.9).

Total de monócitos baço

Monócitos TNF-alfa baço

Figura V.9 – Quantidades de monócitos nos baços dos animais controle e tolerantes.

Quantificação de monócitos contendo TNF, INF e IL-10.

Estudo da expressão gênica nos linfócitos.

Após esta seqüência de análises realizamos a separação dos diferentes tipos de células do baço, através do uso de “beads” magnéticos, isto é micropartículas sintéticas contendo material paramagnético, que sob campo magnético são atraídas e imobilizadas. Na superfície destas partículas há anticorpos específicos para antígenos de superfície como: CD8 e CD4. Desta forma pudemos deixar as células do baço aderindo a frascos de cultura, para reter os monócitos, a seguir submetemos a suspensão celular às partículas com anti CD4, e depois anti CD8. Com esses procedimentos obtivemos os

monócitos, linfócitos CD4 e CD8 e restaram os linfócitos B. Após extração do mRNA, submetemos este material a análise comparativa entre tolerantes e controle, e obtivemos os genes que estão diferentemente expressos na tolerância nas diferentes linhagens celulares.

A comparação entre a expressão de genes dos animais controle e os tolerantes produziu membranas com diferentes densidades nos genes marcados (Figura V.10). A análise destas membranas mostrou que mais de 80 genes têm sua expressão aumentada ou reduzida pela indução com a tolerância (Tabela V.1). Para ser considerado significativamente aumentado ou reduzido foram computados apenas genes com diferença de densidade de duas vezes ou mais. Observamos que os genes para TNF e IL-10 estão com sua expressão alterada nos animais tolerantes, corroborando os achados das dosagens de citocinas plasmáticas nos animais tolerantes.

Conclusão: A indução de tolerância reprograma as células do sistema imunológico para uma resposta inflamatória menos intensa. Parece que a resposta mantém a capacidade de clareamento bacteriano e melhora a resposta neutrofílica para o sítio de infecção bacteriana. Encontramos mais de 40 genes com diferente expressão entre animais controle e tolerantes. Os próximos passos são confirmar por RT-PCR os genes alterados e analisar o papel isolado de cada um deles na indução de tolerância.

ANEXO I

Material e Métodos

Os protocolos experimentais deste estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ou dos laboratórios correspondentes.

Os estudos in vivo foram realizados de acordo com as normas do National Institute of Health e com a aprovação do comitê local IACUC.

Reagentes

LPS (de *Escherichia coli*, sorotipo 0127: B8), inosina, dodecilsulfato sódico, ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico, ácido 2-tiobarbitúrico (4,6-Dihidroxipirimidine-2-thiol), α -fenilefrina, cloreto de acetilcolina, brometo de hexadeciltrimetilamônio, tetra-metil-benzidine, peróxido de hidrogênio, ácido acético, malondealdeído bis(dimetil acetato) e sais foram adquiridos a partir de Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

Indução de endotoxemia

Grupo endotoxêmico

Injeção intraperitoneal (i.p.) de Lipopolisacarídeo (de *Escherichia coli* - Sototipo 026:B6/Sigma) na dose de 10mg/kg [230].

Grupo controle

Injeção intraperitoneal de solução fisiológica 0,9% na dose de 2,94 ml/1000g.

Alteração de temperatura e atividade física

Foram utilizados 7 animais para este estudo. Avaliamos a frequência dos padrões de atividade física e temperatura corpórea central após indução de endotoxemia.

Os animais foram anestesiados e implantado intraperitonealmente um transmissor E-Mitter (Mini Metter®), que monitora variações de temperatura corpórea central e movimentação espontânea dos animais. Um receptor externo à caixa capta os sinais enviados pelo transmissor registrando a cada minuto estes parâmetros em arquivo eletrônico. A gaiola é dotada de sistema de sensores na roda e no comedouro para computar a movimentação espontânea e a procura por alimento (ingesta alimentar). Após um período de cinco dias para adaptação do animal, iniciamos no período claro (7:00h) a aquisição de dados durante dois dias antes da injeção de LPS, que são o controle do próprio animal, e após este período foi injetado LPS 10mg/kg i.p. (7:00h) com aquisição contínua por mais 36 horas.

Histologia

Os animais anestesiados foram intubados e submetidos a uma pressão positiva nas vias aéreas de 5cm de água. Após toracotomia foi realizada a retirada dos pulmões inflados, os quais foram fixados em formol a 10% para posterior processamento em parafina.

Hematoxilina e eosina

Cortes seriados (5 µm) foram desparafinizados em xilol, na sequência o tecido foi hidratado com banhos sucessivos de álcool (absoluto, 95° e 70°) seguido de um banho com água corrente. O tecido foi incubado com Hematoxilina de Harris durante 6 minutos para coloração de núcleos e lavado com água corrente; em seguida foi submetido a lavagem em HCl a 1%, e hidróxido de amônia a 1%, seguido de lavagem em água corrente. Realizou-se incubação por 35 segundos em solução de Eosina e

Floxina (composição em ml/l: eosina a 1% - 111,73; floxina a 1% - 11,17; álcool 95° - 871,51; ácido acético glacial - 5,59). Realizou-se uma última lavagem com xilol e a lâmina montado com resina sintética Entellan[®] (Merck) para fixação da lamínula.

Imunohistoquímica para COX-2

Cortes seriados de parafina (5 µm) foram desparafinizados em xilol. Incubado em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 10 Vol.) durante 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com solução de citrato de sódio 10mM, pH 6,0 em temperatura de 100 °C por 40 minutos. Para o bloqueio de antígenos inespecíficos os tecidos foram incubados com leite desnatado a 2% por 30 minutos. A incubação do anticorpo primário para COX-2 (C20 Santa Cruz) foi realizada a 4 °C por 12 horas, o anticorpo secundário biotinilado (kit Dako LSAB+) foi incubado por 45 minutos a 37 °C. A seguir os cortes foram colocados em solução de cromógeno (70mg de DAB para 70mL de PBS com 4 ml de H₂O₂ 10 Vol.) por 3 minutos para a revelação, seguido de banho em água corrente por 5 minutos. Os tecidos foram contra-corados por Hematoxilina de Harris.

Coloração para evidenciar o colágeno

A densidade de colágeno foi calculada a partir de espécimes corados pelo método Pricrosírius. Cortes seriados de parafina (5 µm) foram desparafinizados em xilol, na seqüência o tecido foi incubado por 2 minutos com ácido fosfomolibdico 0,2%, e colocado em solução de Sírius red 0,1% por 110 minutos, a seguir foi lavado (2 minutos) em ácido clorídrico 0,01N. Finalmente o tecido foi desidratado e montada lâmina e lamínula.

Foi utilizado o sistema de análise de imagens (Quantimet 520 –Leica) para o estudo e quantificação das alterações histológicas pulmonares. Em todos os cortes histológicos foram realizadas contagens em 10 campos aleatórios e calculada a média para a estimativa do valor por animal.

Quantificação de superóxido

Após toracotomia e dissecação, a aorta torácica foi retirada, limpa e seccionada em 2 fragmentos de 8-10mm. Os anéis de aorta foram colocados em cubas com solução de Krebs-Henseleit (composição em mMol/l: CaCl_2 1.6, MgSO_4 1.17, EDTA 0.026, NaCl 130, NaHCO_3 14.9, KCl 4.7, KH_2PO_4 glicose 11) aquecida a 37°C e aerados com carbogênio (O_2 95%, CO_2 5%) por um período de estabilização de 20 minutos; após este período os anéis foram colocados nas cubas aquecidas (37°C) do luminômetro Berthold 9505 (EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany), após incubação com Lucigenina 5×10^{-4} M por 5 minutos foi iniciada a contagem por 20 minutos. Os resultados são expressos em função do peso seco das artérias (cpm/mg de tecido).

Nestes experimentos as artérias dissecadas foram seccionadas em duas para que o estudo controle fosse feito no mesmo animal, ou seja, um pedaço da artéria foi incubado somente com Lucigenina e à outra se adicionou ATP/ADP (1×10^{-3} M).

Também foram realizadas as quantificações de superóxido na presença de indometacina (1×10^{-5} M) e LNAME (1×10^{-3} M).

Quantificação de nitrato

Após toracotomia e dissecação, a aorta torácica (do arco da aorta até o diafragma) foi removida, limpa em solução fisiológica 0,9% e armazenada em tubos criogênicos no freezer -80°C . Do mesmo animal foram retirados 200 mg do pulmão direito, que foi lavado com solução fisiológica 0,9% e armazenado em tubos criogênicos no freezer -80°C . Os tecidos foram homogeneizados em gral de aço inoxidável resfriado com nitrogênio líquido (Bel-Art Products) e pistilo de cerâmica.

Os homogenatos de aorta e pulmão foram ressuspensos em PBS, e divididos em dois tubos; um para a quantificação de proteínas (Bradford) e outro para determinação de nitrato por quimioluminescência em analisador de NO (Sievers, modelo NOA 280, USA). Este método requer a redução de nitrato (NO_3^-) para NO por meio da reação de cloreto de vanádio (VnCl_4) em ácido clorídrico (HCl) a 95°C . O NO gerado é carregado por N_2 , um gás inerte, para uma câmara de geração de ozônio. A reação entre NO e ozônio gera luz, a qual é quantificada por células fotomultiplicadoras.

As curvas de calibração em níveis múltiplos foram realizadas com padrão externo (nitrato de sódio – Aldrich), utilizando-se programa específico (Sievers versão 2.2, USA). Os valores medidos de nitratos em $\mu\text{mol/mg}$ foram corrigidos pela quantidade de proteínas dos homogenatos.

Reatividade vascular da aorta

Após toracotomia e dissecação, a aorta torácica foi retirada, limpa e seccionada em fragmentos de 4-5mm. Os anéis de aorta foram colocados em cubas para órgão isolado com solução de Krebs-Henseleit (composição em mMol/l: CaCl_2 1.6, MgSO_4 1.17, EDTA 0.026, NaCl 130, NaHCO_3 14.9, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, glicose 11) aquecidas a 37°C e aerados com carbogênio (O_2 95%, CO_2 5%). Estes segmentos permaneceram suspensos por um período de estabilização de 60 minutos com uma tensão de 1,5g por duas hastes de aço inoxidável que tracionavam os anéis; aos 20 e 40 minutos a solução de Krebs-Henseleit foi trocada e a tensão reajustada [231, 232]. A haste inferior foi fixada na própria cuba de órgão isolado e a superior permaneceu conectada a um transdutor de tensão (BIOPAC System[®] TSD105A), onde, após o período de estabilização foram realizadas, de acordo com o foco do experimento, curvas dose resposta (CDR) a Noradrenalina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M), Cloreto de Potássio (20-120 mM), Acetilcolina (1×10^{-8} - 1×10^{-5} M); ATP (1×10^{-8} - 1×10^{-4} M) e ADP (1×10^{-8} - 1×10^{-4} M). Nos estudos com ATP e ADP também foram realizados CDR na presença de LNAME 1×10^{-3} M e Indometacina 1×10^{-5} M. Nos estudos com Noradrenalina, Cloreto de Potássio e Acetilcolina também foram realizados CDR na presença de bloqueador de receptores purinérgicos (Suramin 1×10^{-4} M).

Camundongos

Camundongos BALB/C, machos, com 8 semanas de idade foram adquiridos de Taconics Laboratories (MA).

Preparação Animal

Os animais foram injetados com LPS ou salina i.p. Para o estudo de permeabilidade intestinal, os animais foram sacrificados após 16 horas da injeção de LPS a 40 mg/kg. Para todas as outras análises os tecidos foram coletados após 8 horas da injeção de LPS a 100 mg/kg. Para o tratamento os animais foram injetados i.p. com salina ou inosina (100 mg/kg) em um volume de 0.1 ml/10 g do peso corpóreo. Realizamos dois tempos de tratamento: 1- injeção de inosina 30 minutos antes do LPS (INO-pre) ou 2- 60 minutos após LPS (INO-pós).

Protocolos de Tratamento

Os camundongos foram divididos em 5 grupos experimentais: controle, inosina controle, LPS, inosina antes (INO-pre) e inosina após (INO-pós).

- VI. Controle – Animais receberam somente salina fisiológica.
- VII. Inosina controle – Animais foram tratados com inosina e não receberam LPS.
- VIII. LPS – Os camundongos neste grupo receberam LPS i.p. e salina.
- IX. INO-pre – Tratamento com inosina (100 mg/kg) 30 minutos antes da injeção de LPS.
- X. INO-pos – Tratamento com inosina (100 mg/kg) 60 minutos após a injeção de LPS.

Permeabilidade intestinal

A função de barreira da mucosa intestinal foi avaliada pelo clearance de dextran conjugado a isotiocianato fluorescente (4 kDa, FD4) da mucosa para serosa, em preparações saculares de intestino invertido incubado *ex vivo*. O tubo intestinal invertido foi preparado dentro de solução a 0°C de tampão de Krebs-Henseleit (KHBB contendo em mM: HEPES 10, NaCl 137, KCl 5.5, NaHCO₃ 4.2, Na₂HPO₄ 0.3, KHPO₄ 0.4, MgSO₄ 0.4, MgCl₂ 0.5, CaCl₂ 1.3, glicose 19.5). O segmento ileal foi lavado com solução salina e então fechada uma das pontas com fio de algodão 4-0. O intestino foi preenchido com 0.4 ml de KHBB, e imerso em um Becker contendo 50 ml de FD4 (20 µg/ml) em KHBB, mantido sob aeração com 95% O₂ e 5% CO₂ a 37° C.

No início da incubação 1 ml da solução do Becker foi coletada para a determinação da concentração externa (i.e. mucosa) de FD4 ($[FD4_{muc}]$). Após 30 minutos de incubação, foram medidos o diâmetro (D) e comprimento (L) da preparação, a solução de KHBB do interior do intestino (0.4 ml) foi retirada para determinar a concentração interna (i.e. serosa) de FD4 ($[FD4_{ser}]$). A fluorescência foi medida ($\lambda_{ex}=492$ nm; $\lambda_{em}=515$ nm) em um espectrofluorímetro (modelo RF 5301, Shimadzu, Columbia, MD). O clearance de FD4 foi calculado pela equação:

$$\text{Área de superfície mucosa (A)} = \pi LD.$$

$$\text{Massa de FD4 na preparação de intestino pós 30 minutos de incubação (M)} = ([FD4_{ser}]) \times 0.4.$$

$$\text{Massa de FD4 que passou da mucosa para serosa (PR, ng/min)} = M/30 \text{ min.}$$

$$\text{Clearance de FD4 (C, nl/min/cm}^2\text{)} = (PR/[FD4_{muc}])/A.$$

Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)

Intestino fígado e pulmão foram retirados, congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e estocados a -70° C para posteriores dosagens bioquímicas. Os tecidos foram homogeneizados (50 mg/ml) em brometo de hexadeciltrimetilammonium 0.5% com ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico (MOPS) 10 mM e centrifugado a 15.000g por 40 minutos. A suspensão foi sonicada três vezes por 30 segundos. O sobrenadante foi submetido à reação com tetra-metil-benzidina 1.6 mM e 1mM peróxido de hidrogênio. A atividade enzimática foi medida pela absorbância espectrofotométrica a 650 nm na temperatura de 37°C , com o aparelho Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os resultados são expressos como miliunidades de MPO por mg de proteína, que foi determinado pelo ensaio de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, Ca).

Ensaio de Produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A formação de produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico foi utilizada para quantificar a peroxidação lipídica nos tecidos e medido como reativos do ácido

tiobarbitúrico. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de KCl 1.15% na concentração final de 100mg/ml. Um volume de 200 μ l do sobrenadante do homogeneizado foi adicionado a 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico a 0.8%, 200 μ l duodecil sulfato de sódio a 8.1%, 1.5 ml ácido acético 20% (pH 3.5) e 600 μ l de água destilada. A mistura foi aquecida a 90° C por 45 minutos. Posteriormente resfriada a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g, por 10 minutos e a absorbância medida a 532 nm, tendo como padrão externo 1,1,3,3-tetrametoxipropano. A quantidade de lípidos peroxidados foi expressa em nmol TBARS/mg de tecido.

CLP

Um total de 207 camundongos BALB/c machos, de semanas de idade, foram submetidos à ligadura cecal e punção (CLP). Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada intraperitonealmente. Em condições de assepsia, uma laparotomia na linha média abdominal de 2 cm foi realizada para a exposição do ceco. O ceco foi ligado com fio algodão 3.0, abaixo da válvula ileocecal, e perfurado com agulha 18-gauge duas vezes. O ceco foi reintroduzido à cavidade peritoneal e a parede abdominal fechada com fio algodão 4.0. Para controle foram utilizados 20 animais (10 foram tratados como veículo, e 10 tratados com inosina). Todos os animais foram retornados as gaiolas com livre acesso a água e comida.

Grupos estudados

Os animais foram divididos para dois grupos de tratamento:

- III- tratado com inosina dose de 100 mg/kg i.p.,
- IV- veículo (salina isotônica, 0,5 ml).

Os tratamentos foram realizados 1 hora antes da ligadura cecal; outra dose foi repetida após 6 horas. No estudo de sobrevivência doses de inosina foram repetidas a cada 12 horas.

Dosagens

Concentrações plasmáticas de TNF- α , interleucina 6, e interleucina 10.

As concentrações plasmáticas do imunorreativo de TNF- α , IL-6 e IL-10 do camundongo foi determinado pelo ensaio do método de imunoadsorção ligado à enzima, comercialmente disponível (ELISA), seguindo o protocolo do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Cultura quantitativa de bactérias

Para este propósito 12 camundongos foram submetidos a CLP (cinco receberam inosina e sete receberam veículo). Após 24 horas, os animais sobreviventes (n=4/grupo) foram sacrificados e o sangue coletado de forma estéril por punção cardíaca. O fígado e baço foram removidos assepticamente, pesados e homogeneizados em PBS estéril. Diluições sequenciais em PBS de sangue e homogenatos teciduais foram plaqueados em Agar, e a contagem de unidades formadoras de colônia foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C (em condições aeróbicas). Os resultados das culturas são expressos em unidades formadoras de colônia por 100 mg de tecido ou unidades formadoras de colônia por ml de sangue.

Níveis plasmáticos de alanina aminotransaminase, fosfatase alcalina, nitrogênio uréico, creatinina, e amilase. As concentrações plasmáticas de alanina aminotransaminase (ALT), fosfatase alcalina, nitrogênio uréico (BUN), creatinina, e amilase foram determinadas enzimaticamente, usando o analisador químico automático VetScan (Abaxis, Union City, CA).

Quantificação de NAD⁺ e NADH por cromatografia de alta pressão (HPLC). Amostras hepáticas foram homogeneizadas em 400µl cianeto de potássio a 0,2M, hidróxido de

potássio 0,06 M, e ácido batofenantrolinodisulfônico a 1 mM. Cada amostra foi extraída com clorofórmio e centrifugada em 4°C a 15.000 rpm por 5 min. Volumes de 40 µl foram injetados em uma coluna de HPLC. A coluna utilizada foi uma Luna, 3 µm, 150 – 4,60 mm, C-18(2) (Phenomenex, Torrance, CA). Os detectores utilizados foram um detector de fluorescência RF-10AXL (nos parâmetros de comprimento de onda: excitação 330 nm; emissão 460 nm), e um detector de UV SPD-10AV (comprimento de onda de 254 nm). A fase móvel utilizada foi acetato de amônio a 0,2 M e metanol grau HPLC com pH 5,88. O fluxo foi de 1 ml/min, com 96% acetato de amônio e 4% metanol inicialmente e aumento progressivo até 9% metanol em 25 minutos. NAD⁺ e NADH níveis foram expressos como nanomoles por miligrama de tecido.

Dosagens de MIP-1 α e MIP-2 no pulmão e fígado.

As quimiocinas MIP-1 α e MIP-2 foram determinadas em homogenatos teciduais de pulmão e fígado. Os tecidos foram homogeneizados em solução tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA). Após centrifugação (14.000 rpm, 30 minutos), as concentrações de MIP-1 α e MIP-2 foram dosadas em sobrenadante, usando ELISA comercialmente disponível, em acordo com o protocolo do fabricante (R&D Systems). Os níveis de quimiocinas foram normalizados pelo conteúdo de proteínas teciduais, medidas por Bradford.

Experimentos de sobrevivência

Foram utilizados 38 animais submetidos a CLP divididos em tratamento com inosina (100 mg/kg, intraperitoneal; n=19) ou veículo (salina isotônica, 0,5 ml, intraperitoneal; n=19), 1 h antes da CLP, após 6 e 12 horas foram administradas doses adicionais de inosina ou veículo. Um segundo grupo de animais foi submetido a CLP para estudo de pós-tratamento. CLP foi realizada em 64 camundongos. Inosina (100 mg/kg, intraperitoneal; n=28) ou veículo (salina isotônica, 0,5 ml, intraperitoneal; n=36) foi administrado após 1 hora e doses adicionais foram administradas após 12 e 24 horas. Neste último grupo de experimentos, o efeito de inosina ou veículo, coadministrado com antibióticos, foi analisado em 53 camundongos. Os animais foram submetidos a

CLP, e após 1 hora receberam intraperitonealmente tratamentos consistindo de inosina (100 mg/kg, n=26) ou salina (0,5 ml, n= 27), e injeção subcutânea de gentamicina (10 mg/kg) e clindamicina (300 mg/kg), dissolvidos em 1 ml de salina. Doses adicionais de inosina e salina foram administradas após 12 e 24 horas, os antibióticos foram administrados a cada 12 horas por um período de 3 dias. A mortalidade dos animais foi seguida durante 1 semana.

Quantificação de expressão gênica para TLR4, TLR2 e iNOS.

Após toracotomia e dissecação, a aorta torácica (do arco da aorta até o diafragma) e 100 mg do pulmão direito foram removidos, limpos em solução fisiológica 0,9% e armazenados em tubos criogênicos a -80°C . Estes tecidos foram homogeneizados em gral de aço inoxidável resfriado com nitrogênio líquido (Bel-Art Products) e pistilo de cerâmica, as amostras foram armazenadas em tubos de 1,5 ml, para a realização da extração de RNA.

Extração de RNA

O RNA total dos homogenatos foi extraído com 1 ml de Trizol[®] (Invitrogen) em tubo de 1,5 ml, seguido de incubação de 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 200 μl de clorofórmio, os tubos foram agitados e incubados por 3 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5804 R) a 4°C durante 15 minutos a 12000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 500 μl de isopropanol gelado. Após incubação por 10 minutos a amostra foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 12000g. O sobrenadante foi desprezado e, ao *pellet* foi adicionado 1 ml de etanol 70% gelado seguido de centrifugação a 4°C durante 5 minutos a 7500g. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi reconstituído em 50 μL de água com 0,1% de Dietilpirocarbonato (Sigma) e armazenado a -80°C .

Amplificação de TLR4, TLR2 e iNOS por RT PCR.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método *in vitro* que amplifica enzimaticamente seqüências específicas de DNA *in vitro* utilizando pequenos oligonucleotídeos de 18 a 25 bases que se ligam a determinadas regiões de interesse do genoma.

O procedimento consiste de uma série de ciclos repetidos de amplificação. Os produtos sintetizados servem como moléculas-molde no próximo, duplicando o número de moléculas a cada ciclo, criando uma reação em cadeia. Após 20 ciclos, a amplificação é de aproximadamente 10^6 a 10^8 .

Essa amplificação pode ser obtida também utilizando o RNA como material iniciador. Esse procedimento, denominado RT-PCR, é realizado por meio da reação de transcrição reversa, seguida de PCR convencional no cDNA.

A partir de 1 µg de RNA total, o cDNA foi sintetizado com 1µl de transcriptase reversa Impron II (Promega); 1 µl de Oligo dT (0,5 µg/µl - Promega); 1 µl de dNTP (10mM – Invitrogen), 6 µl de buffer 5 X ; 0,5 µl de RNAsin (Promega), 2,4 µl de Cloreto de magnésio (25 mM).

A reação foi incubada em termociclador MJ Research PTC-200 por 50 minutos a 42°C e 70 °C por 15 minutos.

Após a síntese de cDNA foi feita uma reação de PCR para amplificação de GAPDH como controle positivo e teste da viabilidade de cada amostra.

A reação de PCR foi realizada com 25 µl de volume total com 17,75 µl de água deionizada; 2,5 µl de tampão (10X); 1µl de cloreto de magnésio a 50 mM; 0,5µl mM de dNTPs (10mM); 1 µl de cada primer a 10 pmol/µl; 0,25 µl de Taq polimerase (Invitrogen) e 1 µl de cDNA em termociclador PTC 200 MJ Research.

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os componentes da reação, menos o cDNA) para eliminar uma possível contaminação da reação.

Para a avaliação da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em agarose a 1% corado com brometo de etídeo (Horizon® – Life

Technologies). Todas as amostras foram normalizadas com a amplificação do gene rRNA.

Foram utilizados os seguintes primers (Invitrogen):

TLR4 sense: AAGAGCTGGAATACCTGGAC

TLR4 antisense: GAAATGCTACAGTGGCTACC

35 ciclos: 95°C por 5 minutos; 95°C por 30 segundos; 60°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; extensão final de 72°C por 10 minutos, gerando um produto de 620 pb.

TLR2 sense: CAGCTGGAGAACTCTGACCC

TLR2 antisense: CAAAGAGCCTGAAGTGGGAG

35 ciclos: 95°C por 5 minutos; 95°C por 30 segundos; 60°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; extensão final de 72°C por 10 minutos, gerando um produto de 200 pb.

iNOS sense: CACCTTGGAGTTCACCCAGT

iNOS antisense: ACCACTCGTACTTGGGATGC

35 ciclos: 94°C por 0,5 minuto; 92°C por 1 minuto; 63,5°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; extensão final de 72°C por 10 minutos, gerando um produto de 170 pares de base.

GAPDH

30 ciclos: 95°C 1 minuto; 60°C 1 minuto, 72°C 1 minuto e extensão de 70°C por 10 minutos, gerando um produto de 320 pb.

Flagelina

Flagelina de *Salmonella entérica* sorotipo Muenchen recombinante foi preparada como descrito previamente (7). Em resumo, o fragmento do gene que corresponde aos amino ácidos de 1 a 156 do gene flagelina da *S. entérica* Muenchen foi gerado por amplificação de PCR com uma sequência inicializadora (sense primer) designada 1S

(5'-CGC GGATCCCAATGGCACAAGTCATTAATACAAACA) e um “antisense primer” designado 468A (5'-TCCGCTCGAGTTAAATAGTTTCACCGTCGT TGGCACC). O gene inteiro da flagelina foi amplificado com primers 1S e 1530A (5'-TCCGCTCGAGTTAACGCAGTAAAGAGAGGACGTTTTG). A parte sublinhada representam seqüências de nucleotídeos adaptadores adicionados as terminações dos “primers” para manter a leitura do segmento e a clonagem (*Bam*HI reconhece sítios no “sense primers” e *Xho*I sítios no “antisense primers”). DNA molde para os PCRs foi o plasmídeo CL402, um clone do pBR322 contendo um fragmento de DNA cromossomal da *S. entérica* serovar Muenchen de 3.8 kb o *Eco*RI que ancora o gene de 1.5 kb da flagelina. DNA de flagelina gerado por PCR foi digerido com *Bam*HI e *Xho*I, purificado com o gel, e subclonado para os sítios na terminação 3' do gene da glutathione S-transferase (GST) no vetor de expressão pGEX-5X-2 (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) e pET 30C (Novagen). Uma única colônia de *E. coli* DH5a (Life Technologies, Gaithersburg, Md.) contendo o plasmídeo desejado foi cultivada em 37°C no meio de cultura Luria contendo 100 µg de ampicilina/ml e então induzida por 3 horas com 0,5 mM IPTG (isopropil-D-tiogalactopiranosida). Após a indução, as bactérias foram retiradas e lavadas com tampão STE (Tris [pH 8] 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM). As células foram suspensas em tampão STE contendo 100 µg de lisozima por ml, incubadas por 45 minutos no gelo, e então ajustado pelo ditioneitol 5 mM (DTT). Após dois congelamentos, a suspensão de células foi sonicada e centrifugada em 10.000 g. O lisado solúvel foi aplicado a uma coluna de glutathione-agarose, lavado com tampão STED (STE e DTT 5 mM), e então eluído com tampão STED contendo glutathione reduzida 10 mM. A pureza da proteína flagelina foi analisada por eletroforese em gel. Proteínas purificadas foram dialisadas contra tampão PBS, e quantificadas pelo método de Bradford, e estocados a -70°C.

Possível contaminação com LPS foi removida pela passagem em uma coluna de polimixina B com descrito previamente (7), resultando em uma preparação de flagelina contendo menos de 20 pg de LPS/µg de flagelina, conforme medida do ensaio cromogênico pelo *Limulus* amebócito.

Dosagem de Glutathione. Os níveis de glutathione reduzida foram determinados como um índice das reservas antioxidantes nos tecidos. Os tecidos foram homogeneizados em ácido sulfosalicílico a 5% (concentração final aproximada de 100 mg/ml). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 20 minutos, e uma alíquota de 20 µl sobrenadante foi submetida à reação com 160 µl Na₂HPO₄ 0,3 M e 20 µl de 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) a 0,04% e 20 µl de citrato de sódio a 1%. A reação foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, a absorbância foi quantificada no leitor de microplaca Spectramax no comprimento de onda de 405nm. As concentrações de GSH foram calculadas a partir da curva padrão construída com concentrações conhecidas de glutathione reduzida e expressas em microgramas por 100 miligramas de tecido.

Imunohistoquímica — Amostras de intestino foram processadas conforme metodologia descrita acima. Para detectar os complexos de poli-(ADP-ribose), foi empregado anticorpo monoclonal anti-poli(ADP-ribose) (Alexis, San Diego, CA) e como controle o anticorpo isotípico correspondente em uma diluição de 1:100 por 2 horas em temperatura ambiente. A imunoreatividade foi detectada pelo anticorpo secundário a partir de cabra anti coelho, biotilado e o complexo de avidina-biotina-peroxidase (ABC) complementado por Vector Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). A cor foi obtida pela reação do substrato Ni-DAB (95 mg de diaminobenzidina, 1,6 g de NaCl, e 2 g de sulfato de níquel em 200 mL de tampão de acetato a 0,1 M). As lâminas foram contra coradas com Nuclear Fast Red. A detecção de nitrotirosina no intestino seguiu a mesma sequência mudando apenas o anticorpo primário para anticorpo de coelho anti-nitrotirosina.

Concentrações plasmáticas de aspartato aminotransferase (AST), nitrogênio uréico (BUN), e creatinina—

Realizados como descrito acima realizado conforme protocolo do fabricante, utilizando o analisador químico VetScan (Abaxis, Union City, CA).

Tolerância

Métodos

Indução de sepse: injeção intraperitoneal de LPS 10 mg/Kg, acompanhamento do animal por 3 dias.

Indução de tolerância ao LPS: injeções intraperitoneais de LPS de 1,0 mg/kg diária por 5 dias consecutivos.

Grupos:

- A- Controle: injeção de 0,5 ml salina estéril intraperitoneal.
- B- Séptico não tolerante: injeção de LPS 10 mg/kg.
- C- Tolerante controle: LPS 0,5 mg/kg 1x/dia, durante 5 dias.
- D- Tolerante com Sepse: LPS 0,5 mg/kg 1x/dia, durante 5 dias e no 6º dia injeção de LPS 10 mg/kg.

Citometria de fluxo

Análise das subpopulações de linfócitos na sepse e na tolerância a LPS. Um mililitro de sangue de cada animal será coletado em um tubo estéril heparinizado, mantido à temperatura de 4°C durante todo o procedimento, para imediata marcação com anticorpos monoclonais específicos para os CD4, 8 e 45R (marcados com FITC) e para citocinas IL-2 e IL-10 (marcados com PE) marcadores específicos para cada tipo celular. A avaliação será feita a partir da análise da imunofluorescência após a marcação com mabs específicos por citometria de fluxo utilizando o FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA): Todo o procedimento será realizado a 4°C. Colocação de 50 µl de sangue total heparinizado por tubo. Adição de 10 µl de IgG humano (10mg/ml), em excesso de cem vezes a concentração normal de IgG no sangue, para bloquear dos sítios de ligação de IgG e evitar a ligação inespecífica das porções Fc dos mAbs. Após 20 minutos, adição de 20µl do mAb anti CD-4 ou CD-8 marcado com

ficoeritrina (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA)) no tubo de prova e 20µl do mAb irrelevante IgG1µl -PE no tubo controle negativo. O controle negativo serve como valor de referência zero para leitura da imunofluorescência do tubo marcado por expressar a ligação inespecífica dos mAbs às células. Após 30 minutos, efetua-se a lise das hemácias com 1 ml de solução de lise conforme as especificações do fabricante. Os tubos serão submetidos à centrifugação por 5 minutos a 1200 rpm, seguida de aspiração a vácuo do sobrenadante, preservando os botões celulares, que será submetido a duas lavagens com solução composta por PBS, azida de sódio a 0,1% e soro bovino fetal (SBF) a 5%, seguidas de aspiração a vácuo do sobrenadante. Por fim, o botão celular será submetido à fixação com uma solução de formaldeído a 1% em PBS com azida de sódio a 01%, seguida de agitação imediata para evitar a formação de agregados celulares pelo formaldeído. A leitura no FACS utilizando o filtro FL2 (vermelho, para a PE) e filtro verde para FITC.

A leitura e análise da fluorescência serão efetuadas com o programa de computador “Cellquest”, do citômetro FACScalibur.

Técnica de “macroarray”

A técnica de “macroarray” baseia-se na imobilização de sequências de genes específicas (sondas) sob uma matriz sólida, as quais são então hibridizadas com cópias marcadas de ácidos nucleicos obtidos a partir da amostra biológica (alvos), no caso das amostras de RNA estas são sintetizadas a cDNA. Esta técnica possibilita observar um aumento ou diminuição na expressão de um gene a partir da variação na quantidade do alvo marcado. No presente estudo será utilizada uma membrana mista (Atlas Array Trial Kit - Clontech laboratories, Inc., Califórnia, EUA), ou seja, que contem genes pertencentes a vários grupos funcionais. A membrana é composta por 500 genes distintos que estão presentes em duplicata.

Obtenção do RNA total

O RNA total das células tratadas e controle será extraído utilizando-se a metodologia do tiocionato de guanidina (Chomczynski e cols., 1987), empregando-se o reagente Trizol (Life Technologies). Resumidamente, 1×10^7 células serão lisadas utilizando 1 ml do reagente, o RNA total será isolado a partir das proteínas e restos celulares acrescentando-se 200 μ L de clorofórmio seguido de centrifugação. A precipitação do RNA total será realizada adicionando-se propanol gelado seguido de centrifugação. Em seguida, o sedimento será lavado em etanol 70% e após secagem a T.A., ressuspensão em água DEPC. O volume de água DEPC utilizado variou de acordo com o tamanho do sedimento obtido não ultrapassando 30 μ L.

Tratamento com a DNase

Para os experimentos de “macroarrays” e RT-PCR, 200 μ g de RNA total de linfócitos e neutrófilos controle e tratados com LPS serão submetidos ao tratamento com DNase, conforme descrito pelo fabricante da membrana (Clontech laboratories, Inc., Califórnia, EUA). Resumidamente, em um tubo de microcentrífuga serão adicionados 200 μ g do RNA total, 20 U de DNase, 40 μ L de tampão da DNase I completando-se com H₂O deionizada livre de RNase para um volume final de 400 μ L. A reação será incubada durante 30 minutos a 37°C. Ao término desse período, adicionou-se 40 μ L da mistura de interrupção de reação (Clontech laboratories, Inc., Califórnia, EUA). Em seguida, o RNA total será purificado com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com acetado de sódio e etanol absoluto (Sambrook e cols., 1989).

Quantificação e avaliação da integridade do RNA total

O RNA total isolado será quantificado por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) a 260 nm e sua pureza (relação A_{260}/A_{280}) será determinada (Sambrook e cols., 1989). A integridade do RNA será avaliada em gel de agarose a 1,2% desnaturante (formaldeído 37%) contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídeo, em tampão MOPS. A separação eletroforética será realizada a 100 V por 1 hora e visibilizado em luz ultravioleta em transiluminador (Pharmacia Biotech., Inc., Uppsala, Suécia) (Sambrook e cols., 1989). Os resultados serão foto-documentados por meio do

aparelho Kodak® Digital Science DC120 Zoom Digital Camera (Gibico-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos) sendo a imagem processada e analisada por meio do software da Kodak Digital Science 1D Image Analysis (Gibico-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

Síntese da sonda de cDNA

O preparo da sonda será realizado utilizando-se o Kit Atlas™ pure total RNA labeling system (Clontech Laboratories, Inc). Resumidamente, a reação de marcação será realizada utilizando 4µL do tampão de reação 5x (fornecido pelo fabricante), 2 µL de uma mistura de dNTP 10x, sendo o ATP marcado com ³³P (10 µCi/µL), 0,5µL de DDT. Essa mistura de reação será acrescentada sobre o tubo contendo 10 µg do RNA total. Em seguida, será acrescentado 1 µL da mistura de “primers” “CDs” e 2µL da enzima de transcrição reversa (MMLV), incubando-se a 50°C durante 25 minutos. Decorrido esse período, a reação será interrompida utilizando 2µL da mistura de terminação 10x fornecida pelo fabricante.

Purificação da sonda marcada

A purificação da sonda será realizada utilizando uma coluna de cromatografia (NucleoSpin Extraction Spin Column). Resumidamente, a sonda será diluída em 200 µL de volume total de tampão NT2 (fornecido pelo fabricante). Esta mistura será adicionada a uma coluna, que será centrifugada a 14.000 rpm por 1 min. Quatrocentos microlitros de tampão NT3 (fornecido pelo fabricante) serão adicionados à coluna e centrifugados a 14.000 rpm durante 1 min. Este procedimento será repetido por 3 vezes. A coluna será transferida para um tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 ml. Serão adicionados 100 µL de tampão NE deixando-se a coluna encharcar por 2 min. A coluna será centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto para eluir a sonda purificada. A radioatividade da sonda será confirmada pela contagem de cintilação.

Hibridização

Todas as soluções utilizadas para o procedimento de hibridização serão fornecidas pela Clontech laboratories, Inc. A hibridização será realizada utilizando-se a solução de Express Hyb pré-aquecida a 68°C, contendo 50 µg DNA de

esperma de salmão. Esta solução será adicionada ao tubo de hibridização, contendo a membrana já umedecida em água e proceder-se-á a uma incubação durante 30 min com agitação contínua a 68°C para pré-hibridização. A sonda desnaturada será adicionada e a hibridização e será mantida “overnight” com agitação contínua a 68°C. Em seguida, a membrana hibridizada será submetida a lavagens sucessivas com SSC e SDS. Na fase final, a membrana úmida será imediatamente enrolada em plástico. A membrana Atlas Array será exposta ao intensificador de sinal “Storage Phosphor Screens” e mantidas em cassete durante 2 semanas (Amersham Pharmacia Biotech, UK Limited, Uppsala, Suécia).

Análise dos resultados

Os dados serão obtidos pelo equipamento “Storm” (modelo 840 – Molecular Dynamics) e analisados pelo software Array-Pro™ Analyzer. A interpretação dos mesmos será realizada após a normalização do sinal emitido em cada membrana com o gene da β -actina presente na mesma. Em seguida, será realizada a relação entre os dados obtidos na membrana teste (com tratamento) com os da membrana controle (sem tratamento).

2.3 Confirmação por RT-PCR

As alterações de expressão observadas nos testes com as membranas Atlas Array Rat Kit trial serão confirmadas utilizando-se a técnica de RT-PCR.

Desenho das seqüências dos “primers”

As seqüências dos primers serão desenhadas utilizando o programa “Gene Runner” versão 3.0 a partir das seqüências dos genes. Essas serão obtidas por meio das informações contidas no banco gênico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) acessado via internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez>) a partir do número de acesso presente na relação de genes descritos na membrana.

Reação de transcrição reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) será realizada a partir de 2 µg de RNA total extraídos conforme descrito anteriormente. A síntese do cDNA será realizada utilizando a seguinte mistura de reagentes: 146 ng de “random primers” e 200 U da enzima transcriptase reversa (Super ScriptTM II Rnase H⁻ RT Llife Technologies), tampão da enzima [Tris-HCl a 50 mM (pH 8.0), KCL 75 mM, MgCl₂ 3 mM], DTT a 5 mM, dNTP a 500µM em um volume final de reação de 20µL. Esta mistura final será incubada por 2 min a 25°C para permitir a hibridização dos oligonucleotídeos randômicos ao RNA, seguida de aquecimento a 42°C por 50 min. O cDNA assim obtido será armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Avaliação dos parâmetros da reação em cadeia pela polimerase –PCR

A temperatura de hibridação dos “primers”, concentração de cloreto de magnésio, quantidade da amostra (cDNA) e número de ciclos serão avaliados para compor o modelo de ensaio da PCR. As reações serão realizadas para cada grupo de “primers”: todos os parâmetros serão avaliados utilizando concentrações constantes dos reagentes, ou seja, 200 nM de cada “primer”, 200µM de cada desoxirribonucleotídeo, 2U de Taq DNA polimerase (Amershan Pharmacia Biotec. Inc., Uppsala, Suécia); tampão da PCR contendo: Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3), KCl a 50 mM, gelatina a 0,01% e 1,5 mM de cloreto de magnésio. Contudo, como a concentração de cloreto de magnésio estará sendo avaliada serão realizados testes acrescentando cloreto até a concentração de 3,0 mM. A reação da PCR será realizada em um volume final de 50µL. As reações serão processadas no termociclador (modelo Techne Genius – Uniscience do Brasil, São Paulo, Brasil). Uma vez determinadas as condições da PCR, as amostras serão amplificadas em um volume final de 50 µL, em programa específico para cada gene.

Análise do produto de PCR

Os produtos amplificados serão acrescidos de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol-FF a 0,25% e glicerol a 30%) e avaliados por meio da separação eletroforética em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídeo a 0,5 µg/ml e visibilizados em luz ultravioleta no transiluminador (modelo Macrovue da Pharmacia LKB – Pharmacia Biotech., Inc., Uppsala, Suécia).

A foto-documentação dos produtos amplificados será realizada por meio do aparelho Kodak[®] Digital Science DC120 Zoom Digital Camera (Gibico-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos), sendo a imagem processada e analisada por meio do software da Kodak Digital Science 1D Image Analysis (Gibico-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos). A análise da expressão do RNAm dos genes investigados será avaliada em valores relativos (expressão relativa) entre a densidade óptica da banda correspondente ao produto de amplificação do gene de interesse e a densidade óptica da banda correspondente ao produto de amplificação da β -actina (gene de interesse/ β -actina) para cada amostra.

Indução e monitorização do diabetes. Camundongos, machos, BALB/c foram tratados com estreptozotocina (240 mg/kg IP) ou veículo (tampão citrato). Hiperglicemia foi definida por concentrações sanguíneas de glicose durante o jejum > 200 mg/dL. A atividade da PARP foi inibida pela uso do composto PJ34 (10 mg/kg administrado oralmente por gavagem, 1 vez ao dia, iniciado 1 semana após a estreptozotocina). A hemoglobina glicosilada foi quantificada usando-se reagentes disponíveis comercialmente (Sigma). O conteúdo pancreático de insulina foi mensurado por ELISA no sobrenadante de homogenatos de pâncreas. No grupo de animais controle tratados com insulina foram utilizadas minibombas Alzet contendo insulina, com liberação de insulina bovina na taxa de 50 unidades/kg/d. A liberação de insulina pelas bombas normalizou/previniu o desenvolvimento de hiperglicemia e a disfunção

vascular, confirmando que a hiperglicemia (e não a estreptozotocina *per se*) iniciou a disfunção endotelial.

Imunohistoquímica. Para determinar a quebra de uma fita de DNA no tecido da aorta foi utilizado o kit da Roche, para marcação da extremidade terminal deoxirribonucleotidil transferase mediado por dUTP 36. A ativação da PARP foi detectada *in situ* em material criocongelado, pela reação histoquímica usando-se o NAD⁺ biotilado como o substrato da PARP. A detecção da nitrotirosina nos anéis de aorta foi realizada pelo anticorpo de coelho policlonal anti nitrotirosina.

Estudos *in vitro* em células endoteliais. Isolamos células endoteliais da microvasculatura pulmonary de camundongos PARP^{-/-} e PARP^{+/+} 39. As células foram mantidas em meio de cultura F12/DMEM (1:1) e células HUVEC foram cultivadas em F12, ambas suplementadas com fator de crescimento, heparina 100 µg/l e soro fetal bovino a 10%. Mensuração de quebra de ssDNA usando o ensaio de desenovelamento alcalino e a ativação da PARP pela quantificação de incorporação de [3H]-NAD⁺ a extrato nuclear conforme descrito. Dosagens de fosfatos de alta energia e nucleotídeos de piridina foram realizados por HPLC em uma coluna de HPLC 40 Luna C-18(2) (Phenomenex, Torrance, California).

Mensuração de atividade eNOS nas células endoteliais em cultura foi quantificado pela formação de L-[14C]-citrulline em células em cultura intactas. Síntese protéica *de novo*, foi determinada pela incorporação de amino ácidos marcados com [14C] nas proteínas precipitadas por ácido perclórico, isto foi utilizado como medida da função endotelial.

Ensaio de electromobilidade de extratos proteicos nucleares foram utilizados para detecção de ativação de NF-κB como descrito. Células PARP^{+/+} e PARP^{-/-} foram coletadas 2 h após estimulação com alta glicose, seguido por extração dos núcleos e análise por EMSA. Concentrações de nitrito/nitrato, foram determinadas pelo método da reação de Griess modificada.

Análise estatística

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Para análise estatística de comparação de médias, utilizou-se análise de variância (ANOVA) pareada

ou quando necessário foi utilizada análise de variância não pareada, com teste de Tukey para comparação entre grupos. Teste “t” de student pareado ou não pareado foi utilizado quando pertinente; estas análises foram efetuadas com o programa InStat® - Versão 3.05 (GraphPad Software Incorporation). Foi considerado significativo $p < 5\%$.

Os dados são expressos em média e EPM. Para os resultados das medidas bioquímicas nos tecidos (MPO, TBARS, NAD⁺, e NADH) e para os estudos com aorta, as médias para os diferentes grupos de tratamento foram comparadas pelo teste t de student não pareado. As variáveis plasmáticas foram comparadas por teste não paramétrico (Mann–Whitney). Nos experimentos de sobrevida, foram comparadas as curvas de forma global, usando teste de log-rank. Significância estatística foi considerada para $p < 0.05$.

Referências:

1. Abraham, E., et al., *Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation*. Crit Care Med, 2000. 28(1): p. 232-5.
2. Mills, C.D., M.D. Caldwell, and D.S. Gann, *Evidence of a plasma-mediated "window" of immunodeficiency in rats following trauma*. J Clin Immunol, 1989. 9(2): p. 139-50.
3. Moore, F.A., E.E. Moore, and R.A. Read, *Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome*. New Horiz, 1993. 1(4): p. 538-49.
4. Angus, D.C., et al., *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med, 2001. 29(7): p. 1303-10.
5. Bone, R.C., *Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions*. Ann Intern Med, 1991. 114(4): p. 332-3.
6. Cipolle, M.D., M.D. Pasquale, and F.B. Cerra, *Secondary organ dysfunction. From clinical perspectives to molecular mediators*. Crit Care Clin, 1993. 9(2): p. 261-98.
7. Salvo, I., et al., *The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock*. Intensive Care Med, 1995. 21 Suppl 2: p. S244-9.
8. Brun-Buisson, C., et al., *Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis*. Jama, 1995. 274(12): p. 968-74.
9. Vincent, J.L., *Update on sepsis: pathophysiology and treatment*. Acta Clin Belg, 2000. 55(2): p. 79-87.
10. Silva, E., et al., *Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study)*. Crit Care, 2004. 8(4): p. R251-60.
11. Pollack, M. and C.A. Ohl, *Endotoxin-based molecular strategies for the prevention and treatment of gram-negative sepsis and septic shock*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. 216: p. 275-97.
12. Grinnell, B.W. and D. Joyce, *Recombinant human activated protein C: a system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis*. Crit Care Med, 2001. 29(7 Suppl): p. S53-60; discussion S60-1.
13. Rivers, E., et al., *Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2001. 345(19): p. 1368-77.
14. van den Berghe, G., et al., *Intensive insulin therapy in the critically ill patients*. N Engl J Med, 2001. 345(19): p. 1359-67.
15. Van den Berghe, G., *How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care?* J Clin Invest, 2004. 114(9): p. 1187-95.

16. Annane, D., et al., *Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock*. *Jama*, 2002. 288(7): p. 862-71.
17. Annane, D., *Glucocorticoids in the treatment of severe sepsis and septic shock*. *Curr Opin Crit Care*, 2005. 11(5): p. 449-53.
18. Cao, C., et al., *Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain*. *Am J Physiol*, 1997. 272(6 Pt 2): p. R1712-25.
19. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. *N Engl J Med*, 2000. 343(5): p. 338-44.
20. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *An ancient system of host defense*. *Curr Opin Immunol*, 1998. 10(1): p. 12-5.
21. Skidmore, B.J., et al., *Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities*. *J Immunol*, 1975. 114(2 pt 2): p. 770-5.
22. Strieter, R.M., S.L. Kunkel, and R.C. Bone, *Role of tumor necrosis factor- α in disease states and inflammation*. *Crit Care Med*, 1993. 21(10 Suppl): p. S447-63.
23. Dembic, Z., *Immune system protects integrity of tissues*. *Mol Immunol*, 2000. 37(10): p. 563-9.
24. Pinsky, M.R., et al., *Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality*. *Chest*, 1993. 103(2): p. 565-75.
25. Rietschel, E.T., et al., *Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996. 216: p. 39-81.
26. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug*. *Crit Care Med*, 2002. 30(1 Suppl): p. S58-S63.
27. Kourilsky, P. and P. Truffa-Bachi, *Cytokine fields and the polarization of the immune response*. *Trends Immunol*, 2001. 22(9): p. 502-9.
28. Kaisho, T. and S. Akira, *Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice*. *Trends Immunol*, 2001. 22(2): p. 78-83.
29. Lien, E. and R.R. Ingalls, *Toll-like receptors*. *Crit Care Med*, 2002. 30(1 Suppl): p. S1-S11.
30. Ryan, A.J., et al., *Acute heat stress protects rats against endotoxin shock*. *J Appl Physiol*, 1992. 73(4): p. 1517-22.
31. Titheradge, M.A., *Nitric oxide in septic shock*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1411(2-3): p. 437-55.
32. Connor, T.J., et al., *Inhibition of constitutive nitric oxide production increases the severity of lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a role for TNF- α* . *Neuroimmunomodulation*, 2002. 10(6): p. 367-78.
33. McCarthy, D.O., M.J. Kluger, and A.J. Vander, *Effect of centrally administered interleukin-1 and endotoxin on food intake of fasted rats*. *Physiol Behav*, 1986. 36(4): p. 745-9.

34. Swiergiel, A.H. and A.J. Dunn, *Distinct roles for cyclooxygenases 1 and 2 in interleukin-1-induced behavioral changes*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 302(3): p. 1031-6.
35. Dantzer, R., *Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications*. Ann N Y Acad Sci, 2001. 933: p. 222-34.
36. Shen, Y., et al., *Differential effect of chronic antidepressant treatments on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavioural symptoms in the rat*. Life Sci, 1999. 65(17): p. 1773-86.
37. Bluthé, R.M., et al., *Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice*. Eur J Neurosci, 2000. 12(12): p. 4447-56.
38. Givalois, L., et al., *Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats*. Am J Physiol, 1994. 267(1 Pt 2): p. R164-70.
39. Tesfagzi, Y., et al., *Bcl-2 mediates sex-specific differences in recovery of mice from LPS-induced signs of sickness independent of IL-6*. J Appl Physiol, 2001. 91(5): p. 2182-9.
40. Suffredini, A.F., et al., *The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin*. N Engl J Med, 1989. 321(5): p. 280-7.
41. Can, C., et al., *Contradictory effects of chlorpromazine on endothelial cells in a rat model of endotoxic shock in association with its actions on serum TNF-alpha levels and antioxidant enzyme activities*. Pharmacol Res, 2003. 48(3): p. 223-30.
42. Oda, M., J.Y. Han, and M. Nakamura, *Endothelial cell dysfunction in microvasculature: relevance to disease processes*. Clin Hemorheol Microcirc, 2000. 23(2-4): p. 199-211.
43. Panzer, U. and M. Ugucioni, *Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines*. Eur J Immunol, 2004. 34(12): p. 3682-9.
44. Corbel, M., et al., *Repeated endotoxin exposure induces interstitial fibrosis associated with enhanced gelatinase (MMP-2 and MMP-9) activity*. Inflamm Res, 2001. 50(3): p. 129-35.
45. Jaffe, E.A., *Cell biology of endothelial cells*. Hum Pathol, 1987. 18(3): p. 234-9.
46. Tran, Q.K., K. Ohashi, and H. Watanabe, *Calcium signalling in endothelial cells*. Cardiovasc Res, 2000. 48(1): p. 13-22.
47. Vane, J.R., E.E. Anggard, and R.M. Botting, *Regulatory functions of the vascular endothelium*. N Engl J Med, 1990. 323(1): p. 27-36.
48. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. 288(5789): p. 373-6.
49. Furchgott, R.F., *The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor*. Acta Physiol Scand, 1990. 139(2): p. 257-70.

50. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(24): p. 9265-9.
51. Murad, F., et al., *Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation*. Prog Clin Biol Res, 1987. 249: p. 65-76.
52. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. 327(6122): p. 524-6.
53. Russo, G., J.A. Leopold, and J. Loscalzo, *Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Vascu Pharmacol, 2002. 38(5): p. 259-69.
54. Behrendt, D. and P. Ganz, *Endothelial function. From vascular biology to clinical applications*. Am J Cardiol, 2002. 90(10C): p. 40L-48L.
55. Chen, S.J., et al., *Hyperpolarization contributes to vascular hyporeactivity in rats with lipopolysaccharide-induced endotoxic shock*. Life Sci, 2000. 68(6): p. 659-68.
56. Wu, L., et al., *Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(18): p. 7094-9.
57. Griending, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 2000. 86(5): p. 494-501.
58. Souza, H.P., A.J. Cardounel, and J.L. Zweier, *Mechanisms of free radical production in the vascular wall*. Coron Artery Dis, 2003. 14(2): p. 101-7.
59. Javesghani, D., et al., *Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide-treated rats and pigs*. Shock, 2003. 19(5): p. 486-93.
60. Cooke, C.L. and S.T. Davidge, *Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. 282(2): p. C395-402.
61. Szabo, C., *Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity*. Toxicol Lett, 2003. 140-141: p. 105-12.
62. Pearson, J.D. and J.L. Gordon, *Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides*. Nature, 1979. 281(5730): p. 384-6.
63. Pearson, J.D. and J.L. Gordon, *Nucleotide metabolism by endothelium*. Annu Rev Physiol, 1985. 47: p. 617-27.
64. Gordon, J.L. and W. Martin, *Endothelium-dependent relaxation of the pig aorta: relationship to stimulation of 86Rb efflux from isolated endothelial cells*. Br J Pharmacol, 1983. 79(2): p. 531-41.
65. Dawicki, D.D., K.C. Agarwal, and R.E. Parks, Jr., *Role of adenosine uptake and metabolism by blood cells in the antiplatelet actions of dipyridamole, dilazep and nitrobenzylthioinosine*. Biochem Pharmacol, 1985. 34(22): p. 3965-72.
66. Cattaneo, M., et al., *Released adenosine diphosphate stabilizes thrombin-induced human platelet aggregates*. Blood, 1990. 75(5): p. 1081-6.

67. Borst, M.M. and J. Schrader, *Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine*. *Circ Res*, 1991. 68(3): p. 797-806.
68. Gorman, M.W., et al., *Interstitial adenosine concentration during norepinephrine infusion in isolated guinea pig hearts*. *Am J Physiol*, 1991. 261(3 Pt 2): p. H901-9.
69. Gorman, M.W., et al., *Adenosine release and high energy phosphates in intact dog hearts during norepinephrine infusion*. *Circ Res*, 1992. 70(6): p. 1146-51.
70. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. *Pharmacol Rev*, 1998. 50(3): p. 413-92.
71. Burnstock, G. and C. Kennedy, *Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?* *Gen Pharmacol*, 1985. 16(5): p. 433-40.
72. Dunn, P.M., Y. Zhong, and G. Burnstock, *P2X receptors in peripheral neurons*. *Prog Neurobiol*, 2001. 65(2): p. 107-34.
73. De Mey, J.G. and P.M. Vanhoutte, *Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries*. *J Physiol*, 1981. 316: p. 347-55.
74. Brizzolara, A.L., R. Crowe, and G. Burnstock, *Evidence for the involvement of both ATP and nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in the rabbit portal vein*. *Br J Pharmacol*, 1993. 109(3): p. 606-8.
75. Liu, S.F., et al., *Role of nitric oxide and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in mediating nonadrenergic, noncholinergic relaxation in guinea-pig pulmonary arteries*. *Br J Pharmacol*, 1992. 107(3): p. 861-6.
76. Chapal, J. and M.M. Loubatieres-Mariani, *Evidence for purinergic receptors on vascular smooth muscle in rat pancreas*. *Eur J Pharmacol*, 1983. 87(4): p. 423-30.
77. Jin, J., et al., *Distribution of P2Y receptor subtypes on haematopoietic cells*. *Br J Pharmacol*, 1998. 123(5): p. 789-94.
78. Di Virgilio, F. and A. Solini, *P2 receptors: new potential players in atherosclerosis*. *Br J Pharmacol*, 2002. 135(4): p. 831-42.
79. Goepfert, C., et al., *CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis*. *Mol Med*, 2000. 6(7): p. 591-603.
80. Korenaga, R., et al., *Sp1-mediated downregulation of P2X4 receptor gene transcription in endothelial cells exposed to shear stress*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 280(5): p. H2214-21.
81. Kunapuli, S.P. and J.L. Daniel, *P2 receptor subtypes in the cardiovascular system*. *Biochem J*, 1998. 336 (Pt 3): p. 513-23.
82. Garcia Soriano, F., A.C. Seguro, and I. Tadeu Velasco, *The role of potassium in the regulation of adenosine production by ATP-diphosphohydrolase on the endothelial cell membrane*. *Int J Mol Med*, 2000. 5(1): p. 71-6.
83. Li, J.M. and A.M. Shah, *Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. 287(5): p. R1014-30.

84. Godin, C., et al., *Interactions between neutrophils and endothelial cells*. J Cell Sci, 1993. 106 (Pt 2): p. 441-51.
85. Peters, K., et al., *Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis*. Cardiovasc Res, 2003. 60(1): p. 49-57.
86. Liaudet, L., et al., *Protection against hemorrhagic shock in mice genetically deficient in poly(ADP-ribose)polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(18): p. 10203-8.
87. Erol, A. and S. Kosay, *Effects of aminoguanidine administration on vascular hyporeactivity in thoracic aorta from endotoxaemic rats*. Eur J Pharmacol, 2000. 408(2): p. 175-81.
88. Chauhan, S.D., et al., *Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice*. Faseb J, 2003. 17(6): p. 773-5.
89. Julou-Schaeffer, G., et al., *Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway*. Am J Physiol, 1990. 259(4 Pt 2): p. H1038-43.
90. Parker, J.L. and H.R. Adams, *Selective inhibition of endothelium-dependent vasodilator capacity by Escherichia coli endotoxemia*. Circ Res, 1993. 72(3): p. 539-51.
91. Wakabayashi, I., et al., *Diminution of contractile response of the aorta from endotoxin-injected rats*. Eur J Pharmacol, 1987. 141(1): p. 117-22.
92. Umans, J.G., et al., *Effects of endotoxin in vivo on endothelial and smooth-muscle function in rabbit and rat aorta*. Am Rev Respir Dis, 1993. 148(6 Pt 1): p. 1638-45.
93. Cronstein, B.N., *Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent*. J Appl Physiol, 1994. 76(1): p. 5-13.
94. Hasko, G. and C. Szabo, *Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system*. Biochem Pharmacol, 1998. 56(9): p. 1079-87.
95. Apasov, S., et al., *Role of extracellular ATP and P1 and P2 classes of purinergic receptors in T-cell development and cytotoxic T lymphocyte effector functions*. Immunol Rev, 1995. 146: p. 5-19.
96. Cain, B.S., A.H. Harken, and D.R. Meldrum, *Therapeutic strategies to reduce TNF-alpha mediated cardiac contractile depression following ischemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 1999. 31(5): p. 931-47.
97. Barankiewicz, J. and A. Cohen, *Purine nucleotide metabolism in resident and activated rat macrophages in vitro*. Eur J Immunol, 1985. 15(6): p. 627-31.
98. Juhasz-Nagy, A. and D.M. Aviado, *Inosine as a cardiotonic agent that reverses adrenergic beta blockade*. J Pharmacol Exp Ther, 1977. 202(3): p. 683-95.
99. Hasko, G., et al., *Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock*. J Immunol, 2000. 164(2): p. 1013-9.

100. Wattanasirichaigoon, S., et al., *Effect of mesenteric ischemia and reperfusion or hemorrhagic shock on intestinal mucosal permeability and ATP content in rats*. Shock, 1999. 12(2): p. 127-33.
101. Woollard, K.V., et al., *Inosine as a selective inotropic agent on ischaemic myocardium?* Cardiovasc Res, 1981. 15(11): p. 659-67.
102. Devous, M.D., Sr. and C.E. Jones, *Effect of inosine on ventricular regional perfusion and infarct size after coronary occlusion*. Cardiology, 1979. 64(3): p. 149-61.
103. Czarnecki, W. and K. Herbaczynska-Cedro, *The influence of inosine on the size of myocardial ischaemia and myocardial metabolism in the pig*. Clin Physiol, 1982. 2(3): p. 189-97.
104. Revelly, J.P., et al., *Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall*. Crit Care Med, 1996. 24(8): p. 1345-51.
105. Qu, X.W., et al., *The role of xanthine oxidase in platelet activating factor induced intestinal injury in the rat*. Gut, 1999. 44(2): p. 203-11.
106. Ha, H.C. and S.H. Snyder, *Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(24): p. 13978-82.
107. Kennedy, M., et al., *Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates increased permeability induced by peroxynitrite in Caco-2BBE cells*. Gastroenterology, 1998. 114(3): p. 510-8.
108. Scalia, R., et al., *Time course of endothelial dysfunction and neutrophil adherence and infiltration during murine traumatic shock*. Shock, 1996. 6(3): p. 177-82.
109. Szabo, C., et al., *Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite*. J Clin Invest, 1997. 100(3): p. 723-35.
110. Hayward, R. and A.M. Lefer, *L-arginine attenuates endothelial dysfunction and prolongs survival in rats subjected to traumatic shock*. Endothelium, 1998. 6(1): p. 71-9.
111. Fruchterman, T.M., et al., *Selective microvascular endothelial cell dysfunction in the small intestine following resuscitated hemorrhagic shock*. Shock, 1998. 10(6): p. 417-22.
112. Thiemermann, C., et al., *Role of tumour necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in a rat model of endotoxin shock*. Br J Pharmacol, 1993. 110(1): p. 177-82.
113. Nagy, L.E., *Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. 228(8): p. 882-90.
114. Stein, D., et al., *The polarity of the dorsoventral axis in the Drosophila embryo is defined by an extracellular signal*. Cell, 1991. 65(5): p. 725-35.
115. Tauszig, S., et al., *Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(19): p. 10520-5.

116. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. *Nature*, 1997. 388(6640): p. 394-7.
117. Horng, T. and R. Medzhitov, *Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(22): p. 12654-8.
118. Kelley, K.W., et al., *Cytokine-induced sickness behavior*. *Brain Behav Immun*, 2003. 17 Suppl 1: p. S112-8.
119. Akira, S., *Mammalian Toll-like receptors*. *Curr Opin Immunol*, 2003. 15(1): p. 5-11.
120. Akira, S. and H. Hemmi, *Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family*. *Immunol Lett*, 2003. 85(2): p. 85-95.
121. Vodovotz, Y., et al., *The hepatocyte as a microbial product-responsive cell*. *J Endotoxin Res*, 2001. 7(5): p. 365-73.
122. Takeuchi, O., et al., *Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6*. *Int Immunol*, 2001. 13(7): p. 933-40.
123. Werling, D. and T.W. Jungi, *TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003. 91(1): p. 1-12.
124. Takeuchi, O., et al., *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. *Immunity*, 1999. 11(4): p. 443-51.
125. Ingalls, R.R., et al., *Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors*. *Infect Dis Clin North Am*, 1999. 13(2): p. 341-53, vii.
126. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. *Science*, 1998. 282(5396): p. 2085-8.
127. Homma, T., et al., *Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. 31(4): p. 463-9.
128. Wyllie, D.H., et al., *Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses*. *J Immunol*, 2000. 165(12): p. 7125-32.
129. Jimenez, R., et al., *Role of Toll-like receptors 2 and 4 in the induction of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(12): p. 4637-42.
130. Nedelec, E., et al., *Stimulation of cyclooxygenase-2-activity by nitric oxide-derived species in rat chondrocyte: lack of contribution to loss of cartilage anabolism*. *Biochem Pharmacol*, 2001. 61(8): p. 965-78.
131. Vo, P.A., et al., *autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function*. *J Biol Chem*, 2005. 280(8): p. 7236-43.
132. Henderson, B., S. Poole, and M. Wilson, *Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis*. *Microbiol Rev*, 1996. 60(2): p. 316-41.
133. Glauser, M.P., et al., *Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update*. *Clin Infect Dis*, 1994. 18 Suppl 2: p. S205-16.

134. Blair, D.F., *The bacterial flagellar motor*. Semin Cell Biol, 1990. 1(2): p. 75-85.
135. Namba, K., I. Yamashita, and F. Vonderviszt, *Structure of the core and central channel of bacterial flagella*. Nature, 1989. 342(6250): p. 648-54.
136. Eaves-Pyles, T., et al., *Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction*. J Immunol, 2001. 166(2): p. 1248-60.
137. Komoriya, K., et al., *Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 1999. 34(4): p. 767-79.
138. Ciacchi-Woolwine, F., et al., *Salmonella flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line*. Infect Immun, 1998. 66(3): p. 1127-34.
139. Gewirtz, A.T., et al., *Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response*. J Clin Invest, 2001. 107(1): p. 99-109.
140. McDermott, P.F., et al., *High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation*. Infect Immun, 2000. 68(10): p. 5525-9.
141. Moors, M.A., L. Li, and S.B. Mizel, *Activation of interleukin-1 receptor-associated kinase by gram-negative flagellin*. Infect Immun, 2001. 69(7): p. 4424-9.
142. Steiner, T.S., et al., *Enterotoxigenic Escherichia coli expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells*. J Clin Invest, 2000. 105(12): p. 1769-77.
143. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. Nature, 2001. 410(6832): p. 1099-103.
144. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response*. Semin Immunol, 1998. 10(5): p. 349-50.
145. Zhang, G. and S. Ghosh, *Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity*. J Clin Invest, 2001. 107(1): p. 13-9.
146. Qureshi, S.T., et al., *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)*. J Exp Med, 1999. 189(4): p. 615-25.
147. Chow, J.C., et al., *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction*. J Biol Chem, 1999. 274(16): p. 10689-92.
148. Szabo, C., *Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock*. New Horiz, 1995. 3(1): p. 2-32.
149. Spapen, H., H. Zhang, and J.L. Vincent, *Potential therapeutic value of lazarets in endotoxemia and other forms of sepsis*. Shock, 1997. 8(5): p. 321-7.
150. Aliprantis, A.O., et al., *Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2*. Science, 1999. 285(5428): p. 736-9.

151. Cholle-Martin, S., et al., *Interactions between neutrophils and cytokines in blood and alveolar spaces during ARDS*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 154(3 Pt 1): p. 594-601.
152. Pompe, J.C., et al., *Nebulization of endotoxin during mechanical ventilation: an experimental model of ARDS in pigs*. Adv Exp Med Biol, 1996. 388: p. 599-602.
153. Rabinovici, R., et al., *ARDS-like lung injury produced by endotoxin in platelet-activating factor-primed rats*. J Appl Physiol, 1993. 74(4): p. 1791-802.
154. Wheeldon, E.B., et al., *Intratracheal aerosolization of endotoxin in the rat: a model of the adult respiratory distress syndrome (ARDS)*. Lab Anim, 1992. 26(1): p. 29-37.
155. Feldman, M., et al., *Role of flagella in pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection*. Infect Immun, 1998. 66(1): p. 43-51.
156. Ring, A. and W. Stremmel, *The hepatic microvascular responses to sepsis*. Semin Thromb Hemost, 2000. 26(5): p. 589-94.
157. Fishman, D., et al., *L-canavanine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, improves venous return in endotoxemic rats*. Crit Care Med, 1997. 25(3): p. 469-75.
158. Mulder, M.F., et al., *The fall of cardiac output in endotoxemic rats cannot explain all changes in organ blood flow: a comparison between endotoxin and low venous return shock*. Shock, 1996. 5(2): p. 135-40.
159. van Lambalgen, A.A., N. Bouriquet, and D. Casellas, *Effects of endotoxin on tone and pressure-responsiveness of preglomerular juxtamedullary vessels*. Pflugers Arch, 1996. 432(3): p. 574-7.
160. Begany, D.P., et al., *Inhibition of type IV phosphodiesterase by Ro 20-1724 attenuates endotoxin-induced acute renal failure*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. 278(1): p. 37-41.
161. Parrillo, J.E., et al., *Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy*. Ann Intern Med, 1990. 113(3): p. 227-42.
162. Bone, R.C., 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, 1992. 101(6): p. 1644-55.
163. Holzheimer, R.G., et al., *Intraabdominal infections: classification, mortality, scoring and pathophysiology*. Infection, 1991. 19(6): p. 447-52.
164. Bone, R.C., *The pathogenesis of sepsis*. Ann Intern Med, 1991. 115(6): p. 457-69.
165. Abraham, E., *Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis*. Intensive Care Med, 1999. 25(6): p. 556-66.
166. Szabo, C., et al., *DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(5): p. 1753-8.

167. Szabo, C., B. Zingarelli, and A.L. Salzman, *Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite*. *Circ Res*, 1996. 78(6): p. 1051-63.
168. Yabuki, M., et al., *Oxygen-dependent fragmentation of cellular DNA by nitric oxide*. *Free Radic Res*, 1997. 26(3): p. 245-55.
169. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. *J Biol Chem*, 1994. 269(42): p. 26066-75.
170. Liaudet, L., et al., *Poly (ADP-ribose) synthetase mediates intestinal mucosal barrier dysfunction after mesenteric ischemia*. *Shock*, 2000. 14(2): p. 134-41.
171. Szabo, C. and V.L. Dawson, *Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion*. *Trends Pharmacol Sci*, 1998. 19(7): p. 287-98.
172. Szabo, C., et al., *Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(7): p. 3867-72.
173. Oliver, F.J., et al., *Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice*. *Embo J*, 1999. 18(16): p. 4446-54.
174. de Murcia, G. and J. Menissier de Murcia, *Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor*. *Trends Biochem Sci*, 1994. 19(4): p. 172-6.
175. Garcia Soriano, F., et al., *Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation*. *Nat Med*, 2001. 7(1): p. 108-13.
176. Zingarelli, B., et al., *Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide*. *J Immunol*, 1996. 156(1): p. 350-8.
177. Szabo, C., et al., *Peroxynitrite causes energy depletion and increases permeability via activation of poly (ADP-ribose) synthetase in pulmonary epithelial cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. 16(2): p. 105-9.
178. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: p. 225-60.
179. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. *J Immunol*, 1991. 147(11): p. 3815-22.
180. Standiford, T.J., et al., *Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor*. *J Immunol*, 1995. 155(4): p. 2222-9.
181. Zingarelli, B., A.L. Salzman, and C. Szabo, *Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Circ Res*, 1998. 83(1): p. 85-94.
182. Zallen, G., et al., *Posthemorrhagic shock mesenteric lymph primes circulating neutrophils and provokes lung injury*. *J Surg Res*, 1999. 83(2): p. 83-8.

183. Zallen, G., et al., *Hypertonic saline resuscitation abrogates neutrophil priming by mesenteric lymph*. J Trauma, 2000. 48(1): p. 45-8.
184. Romano, M., et al., *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment*. Immunity, 1997. 6(3): p. 315-25.
185. Liaudet, L., et al., *Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 165(3): p. 372-7.
186. Saad, M.J., *Molecular mechanisms of insulin resistance*. Braz J Med Biol Res, 1994. 27(4): p. 941-57.
187. Saad, M.J., et al., *Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance*. J Clin Invest, 1992. 90(5): p. 1839-49.
188. Saad, M.F., et al., *A comparison between the minimal model and the glucose clamp in the assessment of insulin sensitivity across the spectrum of glucose tolerance*. Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Diabetes, 1994. 43(9): p. 1114-21.
189. Lima, M.H., et al., *Regulation of IRS-1/SHP2 interaction and AKT phosphorylation in animal models of insulin resistance*. Endocrine, 2002. 18(1): p. 1-12.
190. Xu, J., et al., *Determination of a glucose-dependent futile recycling rate constant from an intraperitoneal glucose tolerance test*. Anal Biochem, 2003. 315(2): p. 238-46.
191. Tooke, J.E. and K.L. Goh, *Vascular function in Type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes: the case for intrinsic endotheiopathy*. Diabet Med, 1999. 16(9): p. 710-5.
192. Keen, H., C. Clark, and M. Laakso, *Reducing the burden of diabetes: managing cardiovascular disease*. Diabetes Metab Res Rev, 1999. 15(3): p. 186-96.
193. Rodriguez-Manas, L., et al., *Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats*. Br J Pharmacol, 1998. 123(8): p. 1495-502.
194. Graier, W.F., et al., *Increased superoxide anion formation in endothelial cells during hyperglycemia: an adaptive response or initial step of vascular dysfunction?* Diabetes Res Clin Pract, 1999. 45(2-3): p. 153-60.
195. Nishikawa, T., et al., *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*. Nature, 2000. 404(6779): p. 787-90.
196. Halliwell, B., *What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo?* FEBS Lett, 1997. 411(2-3): p. 157-60.
197. Kobayashi, T. and K. Kamata, *Effect of insulin treatment on smooth muscle contractility and endothelium-dependent relaxation in rat aortae from established STZ-induced diabetes*. Br J Pharmacol, 1999. 127(4): p. 835-42.
198. Sallmann, F.R., et al., *Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP-1 gene with poly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks*. J Biol Chem, 2000. 275(20): p. 15504-11.

199. Smith, S., et al., *Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres*. Science, 1998. 282(5393): p. 1484-7.
200. Pieper, A.A., et al., *Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death*. Trends Pharmacol Sci, 1999. 20(4): p. 171-81.
201. Pieper, G.M., P. Langenstroer, and W. Siebeneich, *Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals*. Cardiovasc Res, 1997. 34(1): p. 145-56.
202. Du, X., K. Stocklauser-Farber, and P. Rosen, *Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase?* Free Radic Biol Med, 1999. 27(7-8): p. 752-63.
203. Karasu, C., *Time course of changes in endothelium-dependent and -independent relaxation of chronically diabetic aorta: role of reactive oxygen species*. Eur J Pharmacol, 2000. 392(3): p. 163-73.
204. Pieper, G.M., G. Moore-Hilton, and A.M. Roza, *Evaluation of the mechanism of endothelial dysfunction in the genetically-diabetic BB rat*. Life Sci, 1996. 58(9): p. PL147-52.
205. Cosentino, F., et al., *High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells*. Circulation, 1997. 96(1): p. 25-8.
206. Nishigaki, R., et al., *Ultrastructural changes and immunohistochemical localization of nitric oxide synthase, advanced glycation end products and NF-kappa B in aorta of streptozotocin treated Mongolian gerbils*. Nippon Ika Daigaku Zasshi, 1999. 66(3): p. 166-75.
207. Eiserich, J.P., et al., *Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils*. Nature, 1998. 391(6665): p. 393-7.
208. Pieper, G.M. and H. Riaz ul, *Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C*. J Cardiovasc Pharmacol, 1997. 30(4): p. 528-32.
209. Morigi, M., et al., *Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF-kB-dependent fashion*. J Clin Invest, 1998. 101(9): p. 1905-15.
210. Barouch, F.C., et al., *Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. 41(5): p. 1153-8.
211. Burkart, V., et al., *Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin*. Nat Med, 1999. 5(3): p. 314-9.
212. Pieper, A.A., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(6): p. 3059-64.
213. Christians, E.S., L.J. Yan, and I.J. Benjamin, *Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners in protection against acute cell injury*. Crit Care Med, 2002. 30(1 Supp): p. S43-S50.
214. West, M.A. and W. Heagy, *Endotoxin tolerance: A review*. Crit Care Med, 2002. 30(1 Supp): p. S64-S73.

215. Staudt, L.M., *Gene expression physiology and pathophysiology of the immune system*. Trends Immunol, 2001. 22(1): p. 35-40.
216. Chung, T.P., et al., *Functional genomics of critical illness and injury*. Crit Care Med, 2002. 30(1 Supp): p. S51-S57.
217. Lepe-Zuniga, J.L. and J. Klostergaard, *Tolerance to endotoxin in vitro: independent regulation of interleukin-1, tumor necrosis factor and interferon alpha production during in vitro differentiation of human monocytes*. Lymphokine Res, 1990. 9(3): p. 309-19.
218. Zuckerman, S.H., G.F. Evans, and L.D. Butler, *Endotoxin tolerance: independent regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression*. Infect Immun, 1991. 59(8): p. 2774-80.
219. Libert, C., et al., *Involvement of the liver, but not of IL-6, in IL-1-induced desensitization to the lethal effects of tumor necrosis factor*. J Immunol, 1991. 146(8): p. 2625-32.
220. Peck, O.M., et al., *Differential regulation of cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-induced tolerance and priming*. Cytokine, 2004. 26(5): p. 202-8.
221. Chan, C., et al., *Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and NF-kappaB transactivation at the IL-1beta promoter*. J Immunol, 2005. 175(1): p. 461-8.
222. Tavares-Murta, B.M., et al., *Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients*. Crit Care Med, 2002. 30(5): p. 1056-61.
223. Secco, D.D., et al., *Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis*. Nitric Oxide, 2003. 9(3): p. 153-64.
224. Fonseca, S.G., et al., *TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis*. Eur J Immunol, 2003. 33(8): p. 2297-306.
225. Ribeiro, R.A., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice*. J Urol, 2002. 167(5): p. 2229-34.
226. Tavares-Murta, B.M., et al., *Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS*. Inflammation, 2001. 25(4): p. 247-53.
227. Benjamim, C.F., S.H. Ferreira, and F.Q. Cunha, *Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis*. J Infect Dis, 2000. 182(1): p. 214-23.
228. Alves-Filho, J.C., et al., *Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. 100 Suppl 1: p. 223-6.
229. Benjamim, C.F., et al., *Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils*. Infect Immun, 2002. 70(7): p. 3602-10.
230. Kim, H.W., P. Breiding, and A.G. Greenburg, *Enhanced modulation of hypotension in endotoxemia by concomitant nitric oxide synthesis inhibition and nitric oxide scavenging*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 1997. 25(1-2): p. 153-62.

231. de Carvalho, M.H., et al., *Comparison of the effect of endothelin on microvessels and macrovessels in Goldblatt II and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats*. *Hypertension*, 1990. 15(2 Suppl): p. I68-71.
232. Nigro, D., et al., *Sex-related differences in the response of spontaneously hypertensive rats to angiotensin-converting enzyme inhibitor*. *Endothelium*, 1997. 5(1): p. 63-71.