

GABRIELA CARVALHO SANTOS FERREIRA

**PAPEL DO NERVO ESPLÂNCNICO NA REGULAÇÃO
IMUNOLÓGICA EM UM MODELO DE PERITONITE SÉPTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo

2023

GABRIELA CARVALHO SANTOS FERREIRA

**PAPEL DO NERVO ESPLÂNCNICO NA REGULAÇÃO
IMUNOLÓGICA EM UM MODELO DE PERITONITE SÉPTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Versão Corrigida

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre A. Steiner

Coorientador: Flávio V. Loures

São Paulo

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, fonte de todo o conhecimento, sem O qual seria impossível superar os diversos impasses intelectuais e emocionais que passei.

Agradeço a minha mãe Neide, a meu pai Cléo e a minha irmã Monique, por estarem sempre comigo, pelo apoio, conversas, incentivos. Por serem um alicerce na minha vida.

Agradeço a meu cachorrinho Theo pelo suporte emocional e companheirismo.

Agradeço a meu psicólogo Thiago Augusto pelo apoio emocional essencial que me permitiu continuar nessa jornada.

Agradeço a todos os professores que tive ao longo da vida, que me ensinaram e incentivaram a seguir uma carreira.

Agradeço a meu orientador Alexandre Steiner pela orientação, paciência, compreensão e ensinamentos.

Agradeço a Monique Fonseca que me ajudou desde o início deste projeto e pelo apoio emocional.

Agradeço a meus amigos e amigas por ouvir e se preocupar com os meus medos, anseios e dificuldades. Também pelos passeios, conversas, comidas e risadas compartilhadas, que permitiram um alívio em meio às dificuldades do mestrado.

Agradeço aos colegas de trabalho do Laboratório de Neuroimunologia da Sepse, Caroline Martins, Eduardo Moretti, Isis Trzan, e Kathia Kato pela convivência, parceria, e ajuda nos experimentos.

Agradeço à Silvana Silva pela assistência técnica.

Agradeço ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, pela oportunidade, apoio e estrutura.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) **processo n° 2019/26164-6**, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e auxílio a pesquisa.

RESUMO

Sabe-se que os nervos autônomos regulam o sistema imunológico, mas embora o papel do nervo vago na imunorregulação tenha sido extensivamente investigado, há poucas informações sobre os papéis desempenhados pelos nervos simpáticos. Neste trabalho avaliamos se e como os nervos esplâncnicos simpáticos regulam a defesa do hospedeiro em um modelo de peritonite em ratos. A denervação esplâncnica bilateral (SplancX) ou cirurgia simulada (Sham) foi realizada uma semana antes do desafio com *E. coli*. O desafio consistia em uma gaze enriquecida com *E. coli* implantada no peritônio. Carga bacteriana, infiltração de leucócitos e marcadores de disfunção orgânica foram avaliados. A carga bacteriana foi maior no sítio primário de infecção (peritônio), seguido pelo baço e pulmões. Em comparação com os ratos Sham, os ratos SplancX foram mais eficientes na eliminação de bactérias no baço e no sítio primário da infecção quando *E. coli* foi administrada na dose de 1×10^4 /rato. No entanto, quando *E. coli* foi administrada em uma dose mais alta, 1×10^6 /rato, a denervação reduziu a carga bacteriana somente no baço. A eficácia do sistema imune nos ratos SplancX não foi promovida pela migração aumentada de leucócitos, pois os grupos não diferiram em relação ao número de células CD45⁺/RP1⁺/CD68⁻ (neutrófilos) ou células CD45⁺/RP1⁻/CD68⁺ (macrófagos) no peritônio, pulmões ou baço. Possivelmente está envolvido o aumento dos mecanismos microbicidas de neutrófilos ou macrófagos. Nossa hipótese é que o aumento da atividade microbicida poderia vir com o custo de aumento dos danos colaterais dos órgãos. No entanto, os resultados revelaram que, em comparação com a cirurgia simulada, o SplancX não aumentou os níveis de marcadores de lesão de órgão estabelecidos. Deve-se considerar, no entanto, que os níveis de tais marcadores não estavam muito acima dos valores de referência no período de tempo do experimento (24 horas). Os dados revelam um papel supressivo dos nervos esplâncnicos no *clearance* bacteriano. Este papel não foi relacionado a mudanças na infiltração de tecidos por neutrófilos e macrófagos dentro de 24 horas após a infecção. Presumivelmente, estão envolvidas alterações na atividade microbicida desses leucócitos. A melhora na eliminação bacteriana na ausência dos nervos esplâncnicos não resultou em dano colateral aumentado, mas tais custos podem se tornar evidentes em outros contextos, como em uma infecção prolongada.

Palavras-chave: carga bacteriana, nervo esplâncnico, reflexo inflamatório, sepse.

ABSTRACT

It is known that autonomic nerves regulate the immune system. But although the roles of the vagus nerve in immunoregulation have been extensively investigated, there is scant information about the roles played by sympathetic nerves. Here, we have assessed whether and how the sympathetic splanchnic nerves regulate host defense in a rat model of peritonitis. Bilateral splanchnic denervation (SplanX) or sham surgery was performed one week before the *E. coli* challenge. The challenge consisted of an *E. coli*-enriched gauze implanted in the peritoneum. Bacterial burden, leukocyte infiltration and organ-injury markers were assessed. Bacterial burden was the highest in the primary site of infection (peritoneum), followed by the spleen and lungs. Compared to the sham-operated rats, the SplanX rats were more efficient at clearing bacteria in the spleen and the primary site of infection when *E. coli* was given at the dose of 1×10^4 /rat. However, when *E. coli* was given at a higher dose 1×10^6 /rat, SplanX reduced bacterial burden only in the spleen. Effectiveness of the immune system in the SplanX rats was not promoted by enhanced migration of leukocytes, as the groups did not differ in relation to the numbers of CD45⁺/RP1⁺/CD68⁻ cells (neutrophils) or CD45⁺/RP1⁻/CD68⁺ cells (macrophages) in peritoneum, lungs, or spleen. Enhancement of microbicidal mechanisms of neutrophils or macrophages are possibly involved. We hypothesized that augmented microbicidal activity could come with the cost of enhanced collateral damage of organs. However, the results revealed that, compared to Sham surgery, SplanX did not increase the levels of established organ-injury markers. It should be considered, though, that the levels of such markers were not well above reference values in the timeframe of the experiment (24 h). The data uncover a suppressive role of the splanchnic nerves on bacterial clearance. This role was not related to changes in the infiltration of tissues by neutrophils and macrophages within 24 h of infection. Changes in the microbicidal activity of these leukocytes are presumably involved. Improved bacterial clearance in the absence of the splanchnic nerves did not result in augmented collateral damage, but such costs might become evidence in other contexts, such as prolonged infection.

Keywords: bacterial burden, inflammatory reflex, sepsis, splanchnic nerve.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Histórico do entendimento da patogênese da sepse.	14
Figura 2. Passos do recrutamento celular.	16
Figura 3. Vias do sistema simpático e parassimpático.	19
Figura 4. O reflexo inflamatório.	21
Figura 5. Diagrama mostrando o conceito atual do reflexo inflamatório.	22
Figura 6. Cronograma dos experimentos.	Erro! Indicador não definido.
Figura 7. Adrenalina circulante.	Erro! Indicador não definido.
Figura 8. Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (CFU)	Erro! Indicador não definido.
Figura 9. Estratégia de gate - análise da contagem de leucócitos.	Erro! Indicador não definido.
Figura 10. Infiltrado leucocitário 24 horas pós infecção.	Erro! Indicador não definido.
Figura 11. Infiltrado leucocitário 6 horas pós infecção. ..	Erro! Indicador não definido.
Figura 12. Razão neutrófilo/macrófago dos animais infectados com 1×10^6 CFU de <i>E. coli</i>/animal.	Erro! Indicador não definido.
Figura 13. Razão neutrófilo/macrófago dos animais infectados com 1×10^4 CFU de <i>E. coli</i>/animal.	Erro! Indicador não definido.
Figura 14. Marcadores de disfunção tecidual dos animais infectados com 1×10^6 CFU de <i>E. coli</i>/animal.	Erro! Indicador não definido.
Figura 15. Marcadores de disfunção tecidual dos animais infectados com 1×10^4 CFU de <i>E. coli</i>/animal.	Erro! Indicador não definido.
Figura 16. Citocinas circulantes.	Erro! Indicador não definido.
Figura 17. IL-10 plasmático.	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChR	Receptor de acetilcolina
APC	Célula apresentadora de antígeno
AR	Adrenoreceptor
CCL	Ligante de quimiocina (motivo C-C)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFU	Unidades formadoras de colônias
CXCL	Ligante de quimiocina (motivo C-X-C)
CXCR	Receptor de quimiocina (motivo C-X-C)
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCLO	Ácido hipocloroso
HMGB1	<i>High mobility group Box-1</i>
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
ICAM	Molécula de adesão intercelular 1
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gama
LB <i>broth</i>	Meio líquido <i>Luria-Bertani</i>

LFA-1	Antígeno 1 associado à função linfocitária
LPS	Lipopolissacarídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NLR	Receptores do tipo NOD
NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio arterial
<i>Poly I:C</i>	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
ROS	Espécies ativas de oxigênio
SaO ₂	Saturação arterial da oxihemoglobina
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
TLR4	Receptor do tipo toll 4
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulador
VACAM-1	Molécula 1 de adesão celular vascular
VLA-4	Antígeno tardio 4

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Sepsis: definição, evolução conceitual e patogênese	12
1.2. Inflamação	14
1.2.1. Reconhecimento e recrutamento celular	15
1.2.2. Mecanismos microbicidas dos fagócitos.....	17
1.3. Regulação da resposta imune.....	18
1.3.1. Sistema nervoso autônomo.....	18
1.3.2. Regulação neural da resposta imune.....	20
1.3.3. Inervação e receptores simpáticos nos órgãos e células imunes	23
2. OBJETIVO	24
2.1. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Cirurgia para denervação esplâncnica ou procedimento <i>Sham</i>	25
3.3. Modelo e indução da sepsis	25
3.4. Coleta de sangue e tecido	26
3.5. Dosagem de adrenalina plasmática	26
3.6. Determinação da carga bacteriana	26
3.7. Análise fenotípica das células por citometria de fluxo	27
3.8. Dosagem de citocinas.....	27
3.9. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	Erro! Indicador não definido.

5. DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
ANEXOS	38
ANEXO A – SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA	38
ANEXO B – DEFINIÇÃO DE SEPSE E SUAS SUBDIVISÕES	39
ANEXO C – PONTUAÇÃO DE AVALIAÇÃO SEQUENCIAL DE FALHA DE ÓRGÃOS RELACIONADA À SEPSE	40
ANEXO D – EQUAÇÃO PARA CÁLCULO DA CONCENTRÇÃO DE <i>E.</i> <i>COLI</i>	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sepses: definição, evolução conceitual e patogênese

O termo sepsis origina-se da palavra Grega *sēpein* que significa putrefação ou podridão.^{1,2} O termo é encontrado em escritos desde a Idade Antiga, e cerca de 400 a.C. Hipócrates o descreveu como uma decadência perigosa e odorífera que poderia acometer o corpo.² Naquela época acreditava-se que essa decomposição tinha princípio no cólon, liberando “princípios perigosos” que poderiam causar “auto-intoxicação”.¹ Na medicina moderna, sepsis refere-se a uma emergência médica de preocupação global, sendo a principal causa de morte em pacientes hospitalizados. O número de casos anuais de sepsis é surpreendentemente alto, chegando até 48,9 milhões de casos por ano em todo o mundo, sendo que destes, 11 milhões culminou em morte.³ Esses números são ainda subestimados, sendo que não há vigilância epidemiológica adequada nos países de baixa e média renda⁴. Os custos hospitalares associados à sepsis são altíssimos, sendo que nos EUA é considerada como a condição de saúde na qual mais dinheiro é despendido, responsável por mais de US\$ 23,7 bilhões por ano⁴. No Brasil, de 2010 a 2019, houve 1.044.227 casos de sepsis e 463.000 óbitos, sendo que a média diária da despesa hospitalar por paciente pode chegar a cerca de R\$ 5140,00 a depender da gravidade⁵.

A definição de sepsis foi primeiramente desenvolvida de forma consensual em 1991 pelo “American College of Chest Physicians” e pela “Society of Critical Care Medicine” (na convenção conhecida como Sepsis-1) como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) causada por uma infecção^{2,6}. A SIRS, por sua vez, é caracterizada pela satisfação de dois ou mais critérios que refletem as manifestações fisiológicas que acompanham a inflamação sistêmica – alteração da temperatura corporal, frequência cardíaca, frequência respiratória –, juntamente com contagens de leucócitos⁷ (**Anexo A**).

Essa definição foi reconhecida como pouco específica e limitada uma vez que os critérios da SIRS são atendidos em uma ampla gama de outras condições, até mesmo uma gripe mais forte.⁸ Em outras palavras, o número de casos de sepsis seria superestimado se todos os pacientes diagnosticados com SIRS fossem considerados realmente pacientes sépticos.⁹ Contudo, levando em consideração as subdivisões da sepsis, as definições são suficientemente discriminativas (**Anexo B**). Assim, sendo a sepsis grave definida como sepsis na presença de disfunção de um ou mais órgãos, e choque séptico definido como sepsis associada a uma hipotensão que é refratária à administração de fluidos cristalóides.¹⁰ Em 2001 houve uma nova

convenção (Sepsis-2) em busca de refinar os critérios diagnósticos da sepse, contudo, por falta de evidências científicas significativas, a definição continuou praticamente inalterada.⁸

Finalmente, em 2016, depois de esforços internacionais para o aumento de pesquisas e padronizações no manejo de pacientes sépticos, uma nova convenção (Sepsis-3) foi realizada para a atualização da definição de sepse e de seus critérios diagnósticos.³ Entre umas das limitações anteriores estava o consenso de que havia uma evolução de sepse para sepse grave, seguido de choque séptico. Na Sepsis-3 o termo ‘sepse grave’ passou a ser chamado de sepse somente, e o conceito de sepse “não grave” foi eliminado.⁶ A partir de então, a sepse ficou definida como uma disfunção orgânica com risco de vida causada pela resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção - definição que se tornou amplamente utilizada em todo o mundo.^{2,3} A disfunção orgânica passou a ser representada pela pontuação sequencial de 2 ou mais pontos na Avaliação Sequencial de Falha de Órgãos (SOFA), a fim de padronizar a gravidade da doença e fornecer associação com mortalidade^{3,6} (**Anexo C**).

As infecções bacterianas causam a grande maioria dos casos de sepse, sendo diversos os agentes etiológicos, incluindo também vírus, parasitas e fungos.¹¹ As principais infecções que geralmente resultam em sepse são as de origem pulmonar, abdominal, e do trato urinário.¹¹ A grande maioria dos casos é causado por bactérias gram-negativas, sendo as mais comuns *Pseudomonas* e *Escherichia coli*.^{11,12,13}

A membrana externa das bactérias gram-negativas é composta por moléculas de lipopolissacarídeos (LPS), conhecido também como endotoxina, o qual é amplamente utilizado para mimetizar a fisiopatologia da sepse em modelos experimentais.¹⁴ Por outro lado, diversos modelos infecciosos são empregados, como a infusão de bactérias vivas na corrente sanguínea, peritonite bacteriana, e, mais frequentemente, a ligadura e perfuração cecal.¹⁵ Apesar de amplamente empregado, o modelo de ligadura e perfuração cecal apresenta uma variabilidade entre animais experimentais e entre experimentadores, pois o tamanho da perfuração não é fácil de controlar. Ainda, mudanças na microbiota intestinal entre grupos experimentais impactam os resultados, uma vez que mudaria o grupo de microorganismos causador da infecção. Portanto, nosso grupo de trabalho optou por empregar um modelo de sepse por infecção monobacteriana. Neste modelo, uma gaze previamente autoclavada é alocada na cavidade abdominal do animal e enriquecida com uma determinada dose de *E. coli*, proporcionando assim o desenvolvimento de uma peritonite séptica monobacteriana.

Assim como houve uma atualização da definição de sepse aos longos dos anos, o conhecimento sobre a patogênese da sepse também foi evoluindo nas últimas décadas.² Inicialmente, na década de 1980, pensava-se que a ação direta dos microrganismos invasores, como a liberação de toxinas, levava ao desarranjo fisiológico. Já na década de 1990, a inflamação, ou seja, a própria resposta do hospedeiro, passou a ser o grande protagonista que culminava no desarranjo fisiológico da sepse.¹⁶ Diversos mediadores foram descritos, sendo o TNF proposto como o mediador central da sepse.¹⁷ Entretanto esse conceito foi rejeitado frente aos fracassos de mais de 100 estudos clínicos com terapias anti-inflamatórias testadas em pacientes sépticos.¹⁸ Esses estudos visavam modificar a resposta inflamatória sistêmica, focando nos mediadores endógenos da inflamação de forma seletiva ou não. Algumas das estratégias utilizadas foram a neutralização de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1), utilização de imunoglobulinas polivalentes, e supressão da inflamação com o uso de corticosteroides.¹⁸ Novos estudos dos anos 2000 até o presente levaram à mais recente ideia conceitual de que ambos, tanto a ação dos agentes infecciosos quanto a resposta inflamatória, são responsáveis pela perda da homeostasia, desencadeando a disfunção orgânica¹⁹ (**Figura 1**).

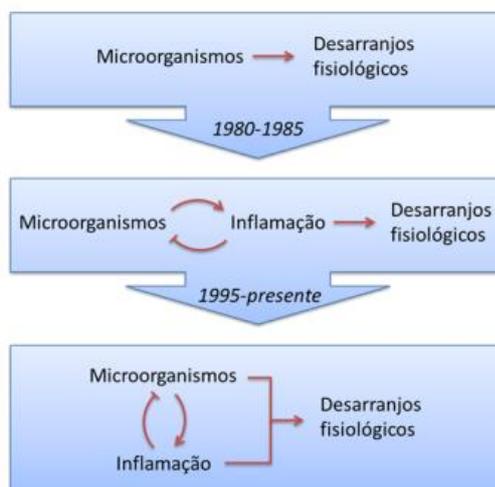


Figura 1. Histórico do entendimento da patogênese da sepse. A flecha com ponta (→) indica estimulação ou consequência. A flecha sem ponta (↔) denota eliminação.

1.1. Inflamação

A resposta imune é um processo natural e necessário para conter microrganismos invasores, que envolve eventos celulares e moleculares de forma coordenada para a proteção

do organismo. A inflamação é um processo fundamental da resposta imunológica, no qual há o recrutamento de leucócitos e proteínas plasmáticas para o local de infecção ou lesão tecidual. Como todo mecanismo biológico, por mais importante que seja, tem um custo para o indivíduo, o processo inflamatório também tem efeitos colaterais.

Quando ocorre de forma desenfreada, a inflamação passa a ser um inimigo para o organismo, com o potencial de causar lesão e doença.²⁰ Em outras palavras, a resposta inflamatória é como uma faca de dois gumes, tem como objetivo principal salvar a vida, contudo, em algumas ocasiões pode causar mais dano do que o agente infeccioso em si. Infecções persistentes, resposta inata insuficiente, ou desequilíbrio de mecanismos reguladores levam a essa situação. Portanto, o equilíbrio entre a proteção e a patogênese se faz necessário para que o organismo consiga superar e eliminar a infecção, mas que ao mesmo tempo não aconteça de forma desregulada, evitando danos colaterais. Na sepse esse equilíbrio não é alcançado, ocasionando uma complexa patofisiologia que desencadeia na disfunção de um ou mais órgãos, podendo levar ao óbito. A desregulação imune na sepse ocasiona a disfunção das células imunes, podendo o problema primordial ser a atividade microbicida enfraquecida dos fagócitos.^{9,21}

A fase inicial da inflamação é crucial para determinar o seu desfecho. A detecção de fatores que interferem na homeostase por receptores e células da imunidade inata provoca a produção e liberação de mediadores e citocinas inflamatórias, e recrutamento celular que vão definir o destino da inflamação.²² A depender do grau da inflamação a fase aguda é suficiente para conter a lesão, assim como responder rapidamente a invasão de forma robusta controla a infecção quando a carga bacteriana é menor, favorecendo assim o hospedeiro com um menor dano colateral^{22,23}

1.1.1. Reconhecimento e recrutamento celular

Quando um patógeno penetra as barreiras iniciais de proteção eles são detectados por células sentinelas, como os macrófagos e células dendríticas, além das células endoteliais^{24,25,26}. Essas células apresentam em sua superfície receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que reconhecem os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs).^{24,27} O reconhecimento desses padrões ativa as vias de sinalização dentro das células, que levam à expressão de genes inflamatórios.²⁷

O processo inicial da inflamação é caracterizado pela ativação de células teciduais e macrófagos residentes com a consequente expressão e liberação de histamina, prostaglandina, e citocinas (incluindo TNF e IL-1), que promovem a vasodilatação arteriolar, o aumento da permeabilidade capilar e o recrutamento celular nas vênulas^{28,29} (**Figura 2**). As citocinas estimulam a expressão de P- e E-selectinas nas células endoteliais, mediando uma fraca ligação aos leucócitos por meio dos ligantes de selectina expressos na membrana dessas células. A velocidade do sangue mais lenta, devido à vasodilatação, favorece a ligação do leucócito e o consequente rolamento da célula. O rolamento facilita a ligação de quimiocinas com os seus receptores no leucócito, resultando no aumentando da afinidade das integrinas do leucócito. Em seguida, acontece a firme adesão mediada pelas integrinas nos leucócitos (LFA-1 ou VLA-4) com seus respectivos ligantes no endotélio (ICAM-1 ou VCAM-1). Assim, ocorre a reorganização do citoesqueleto da célula e a transmigração através do endotélio. A quimiotaxia dos neutrófilos para o sítio inflamatório é dependente da ligação da quimiocina CXCL8 (humanos) ou CXCL1/CXCL2 (murino) ao receptor CXCR2^{30,31}. Enquanto os monócitos expressam CCR2 e se ligam a CCL2 ou CCL7³².

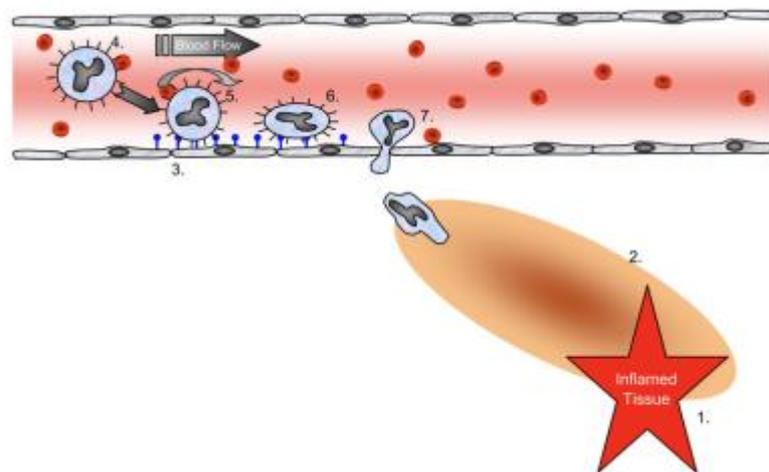


Figura 2. Passos do recrutamento celular. Tecidos lesionados ou inflamados (1) liberam substâncias químicas (2) que podem ser detectadas pelo sistema imunológico. Em resposta a essas substâncias químicas, as células endoteliais produzem moléculas de adesão (3) e os leucócitos que se movem no sangue (4) irão ligar, rolar (5) e aderir (6). A célula imune então sairá do vaso sanguíneo para o tecido inflamado (7). Figura retirada de Kelly *et al.*, 2007 (29).

Os primeiros leucócitos recrutados na fase inicial da inflamação são os neutrófilos, sendo então a primeira linha de defesa da imunidade inata pela sua função fagocítica e capacidade de eliminar microrganismos invasores por diferentes mecanismos.^{28,33} Com o

avanço do processo inflamatório, monócitos circulantes são recrutados, e no tecido sofrem maturação e se transformam em macrófagos, sendo ativados por LPS e por IFN- γ .³⁴ Os macrófagos recrutados diferenciam dos macrófagos residentes principalmente pela alta capacidade fagocítica e microbicida.^{35,36}

1.1.2. Mecanismos microbicidas dos fagócitos

Ao encontrarem o agente invasor no sítio infeccioso os neutrófilos são ativados e os fagocitam. Ao fagocitar, os seus grânulos se fundem com o fagossoma para liberar os produtos antimicrobianos. São simultaneamente também estimulados a produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) através do complexo NADPH oxidase. As ROS como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) ácido hipocloroso (HClO) são altamente reativos, e são liberados no fagolisossomo, que juntamente com proteínas bactericidas matam o patógeno por oxidação^{37,38}. Além de ROS, os neutrófilos produzem óxido nítrico (NO) através da enzima óxido nítrico sintase a partir da L-arginina,^{39,40} que quando combinado com o ânion superóxido, produz peroxinitrito, uma substância com efeitos microbicidas.³¹ Os neutrófilos sofrem também degranulação, liberando o componente citotóxico dos grânulos que irão agir extracelularmente³¹, contribuindo para o dano tecidual durante uma resposta inflamatória desregulada.

Ainda, os neutrófilos conseguem também eliminar patógenos extracelulares através do mecanismo de extrusão de NETs (neutrophil extracellular traps), que são redes compostas de proteínas bactericidas como a elastase e histonas, e de DNA³⁷, formando filamentos que imobilizam o microrganismo, impedindo a sua disseminação e facilitando consequentemente a posterior fagocitose por outros fagócitos⁴¹, já que os neutrófilos geralmente sofrem lise e morrem na formação de NETs.^{31,42}

Assim como os neutrófilos, os macrófagos contêm enzimas lisossômicas que ajudam na degradação e eliminação de patógenos e materiais estranhos e, também produzem ROS e óxido nítrico e superóxido.³⁵ Contudo, diferente dos neutrófilos, os macrófagos são capazes apenas de matar microrganismos fagocitáveis. Produzem citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 e IL-6, que ajudam no recrutamento de mais células imunes para o local da infecção.³⁴ Além disso, os macrófagos são capazes de apresentar antígenos para outras células imunes, interagindo assim com o sistema imune adaptativo.⁴³ Falhas no recrutamento ou nos

mecanismos microbicidas dos fagócitos levam à persistência da infecção, podendo levar à sepse e até a morte do indivíduo infectado⁴⁴.

1.2. Regulação da resposta imune

O próprio sistema imune possui intrinsecamente mecanismos reguladores que ajudam no controle do desencadeamento da resposta inflamatória. A ativação da resposta imunológica está associada a mecanismos de feedback negativos e checkpoints regulatórios que são importantes para manter a regulação fina da inflamação e manter a homeostase imunológica⁴⁵. As células mais estudadas no contexto de imunorregulação são as células T reguladoras (Tregs), que são um subtipo de células T CD4⁺. Essas células suprimem tanto a fase efetora como a ativação de linfócitos T e B convencionais, e inibem a diferenciação de células da imunidade inata^{46,47,48,49}. Há também a imunorregulação endócrina, através do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), o qual tem um papel essencial na sobrevivência durante a sepse, aumentando a resistência ao choque séptico^{50,51,52}, devido ao papel imunossupressor dos glicocorticoides. Esses hormônios agem nas células imunes impedindo a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF, IL-6 e IL-1, alterando a geração de ROS⁵³, promovendo um fenótipo anti-inflamatório, prevenindo a expressão de moléculas coestimuladoras na superfície de APCs, e promovendo a diferenciação de células T reguladoras⁵⁴. Ainda, há também os mecanismos reguladores neurais, que são menos compreendidos e foram o foco deste trabalho. A regulação neural da resposta imune ocorre através da inervação autônoma de órgãos imunes primários e secundários e a consequente ação dos neurotransmissores nas células imunes.

1.2.1. Sistema nervoso autônomo

O sistema nervoso autônomo (SNA) é crucial na manutenção da homeostase do organismo, sendo responsável pelo controle involuntário de processos fisiológicos como regulação da temperatura corporal, metabolismo, digestão, pressão arterial, frequência cardíaca, e excitação sexual. O SNA é controlado por centros localizados na medula espinhal, no tronco encefálico, e no hipotálamo⁵⁵. Essas regiões recebem impulsos nervosos de diferentes áreas do cérebro, como o córtex cerebral e o sistema límbico, e recebem informações sensoriais dos órgãos torácicos e abdominais através de nervos cranianos e espinhais, além de sinais humorais

ao nível da barreira hematoencefálica⁵⁶. Esses sinais aferentes são integrados e controlados para o impulso eferente de respostas em diversas partes do corpo.

O SNA pode ser subdividido em simpático e parassimpático, os quais são relacionados a funções basicamente divergentes. De forma resumida, o sistema nervoso autônomo simpático é relacionado à vigília, mecanismos de “luta e fuga”, enquanto o sistema nervoso autônomo parassimpático é associado a condições de repouso^{55,56}. Na realidade, nem sempre as funções de ambos serão estritamente separadas, sendo que certas vezes tanto o simpático quanto o parassimpático são ativados simultaneamente. Por exemplo, a ereção peniana pode ativar tanto o sistema nervoso simpático, que aumenta a frequência cardíaca e o fluxo sanguíneo para a área genital, quanto o sistema nervoso parassimpático, que promove o relaxamento e a função sexual.⁵⁷ Além disso, os neurônios parassimpáticos dependem dos nervos simpáticos para preservar suas características e funções normais.⁵⁸ A ativação simultânea do simpático e parassimpático parece ser também o mecanismo de regulação neural da inflamação, trabalhando de forma sinergista para o fino ajuste necessário na relação custo-benefício da inflamação.⁵⁹

Os neurotransmissores liberados pelos neurônios do sistema nervoso autônomo são a acetilcolina e a noradrenalina. As fibras nervosas que liberam acetilcolina são chamadas de fibras colinérgicas, enquanto as fibras nervosas que liberam noradrenalina são denominadas de fibras adrenérgicas^{55,56}. Basicamente todos os neurônios pré-ganglionares autônomos liberam acetilcolina, além dos neurônios pós-ganglionares parassimpáticos. E a maioria dos neurônios pós-ganglionares simpáticos liberam noradrenalina (**Figura 3**). Fibras colinérgicas também inervam a medula da glândula suprarrenal, cujas células funcionam como neurônios pós-

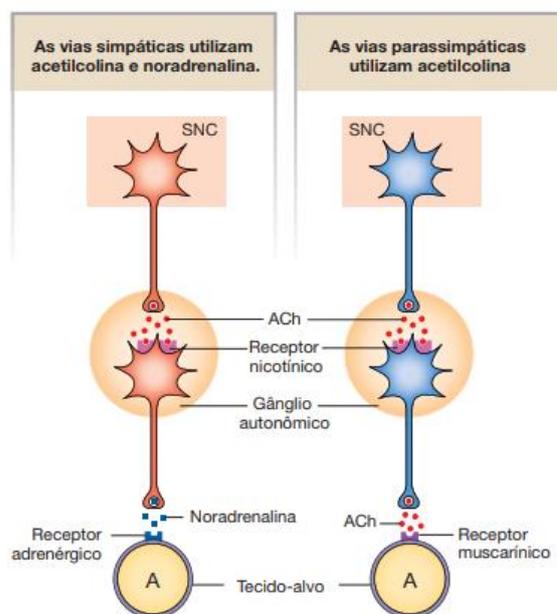


Figura 3. Vias do sistema simpático e parassimpático. Silverthorn, Fisiologia Humana, 7. Ed., 2017

ganglionares modificados, liberando noradrenalina e, principalmente, adrenalina na corrente sanguínea⁵⁶.

O mesmo neurotransmissor pode atuar excitando ou inibindo diferentes células e órgãos a depender do receptor em que se liga e da célula na qual o receptor está acoplado^{55,56,60}. A acetilcolina se liga a receptores nicotínicos, excitando os neurônios pós-ganglionares, e se liga a receptores muscarínicos no tecido efetor. Já a adrenalina e a noradrenalina se ligam a receptores adrenérgicos, que são de duas classes, α -adrenérgicos e β -adrenérgicos, que diferem entre si pela afinidade para noradrenalina e pela distribuição tecidual⁵⁶.

1.2.2. Regulação neural da resposta imune

Estudos iniciais sobre o controle neural da inflamação levaram à descoberta do mecanismo conhecido como reflexo inflamatório. Esse mecanismo é composto pela anti-inflamatória colinérgica, descrita pelo grupo de pesquisa de Kevin Tracey. A estimulação do nervo vago in vivo durante desafio com LPS inibiu a síntese de TNF e preveniu o choque séptico, enquanto a vagotomia cervical ocasionou o aumento da síntese dessa citocina⁶¹. Vagotomia bilateral subdiafragmática também aumentou os níveis de TNF e outras citocinas pró-inflamatórias⁶². A atenuação da inflamação sistêmica pela via anti-inflamatória colinérgica tem sido associada à acetilcolina liberada pelos terminais do nervo vago eferente, inibindo a ativação de macrófagos⁶³ e de citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β , e IL-18^{59,61,63}. As fibras eferentes do ramo celíaco do nervo vago terminam no gânglio celíaco, não havendo, portanto, sinapse entre as fibras colinérgicas e leucócitos nos tecidos⁶⁴. A integração dessa via acontece através de ramos do nervo vago que fazem conexões no gânglio celíaco e no gânglio mesentérico superior, de onde saem as fibras catecolaminérgicas do esplênico, as quais terminam adjacentes a células imunes. Já no baço, um subtipo de células T residentes são estimuladas através do receptor β 2. Esses linfócitos expressam a enzima acetilcolinesterase, sendo então estimuladas a produzir a acetilcolina que irão estimular os receptores nicotínicos α 7 expressos em macrófagos esplênicos, os quais são estimulados a alterar o seu padrão fenotípico^{65,66,67} (**Figura 4**).

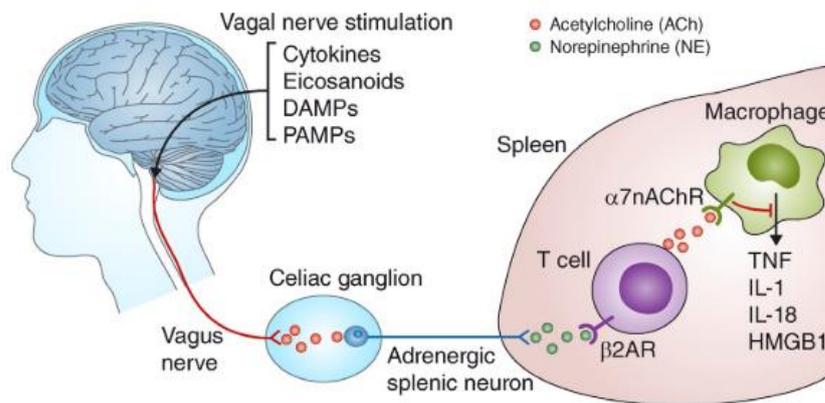


Figura 4. O reflexo inflamatório. O protótipo do circuito reflexo que regula a imunidade é composto de sinais aferentes e eferentes transmitidos no nervo vago em resposta aos produtos moleculares de infecção e lesão, incluindo citocinas, eicosanóides, DAMPs e PAMPs. A ativação de neurônios adrenérgicos no baço culmina na liberação de norepinefrina nas proximidades das células T capazes de secretar acetilcolina. A acetilcolina atravessa a zona marginal e entra na polpa vermelha, onde interage com $\alpha 7$ nAChR expresso em macrófagos produtores de citocinas. A transdução do sinal $\alpha 7$ nAChR suprime a síntese e liberação de TNF, IL-1, IL-18, HMGB1 e outras citocinas. Figura retirada de Andersson and Tracey (68).

Essas interconexões com o nervo vago e a regulação inflamatória tem sido amplamente estudada e a estimulação do nervo vago tem sido utilizada como terapia em doenças inflamatórias^{68,69,70} e, ainda experimentalmente, no controle da sepse^{71,71,72,73}. No entanto, mais recentemente, outras vias neurais, integradas por nervos simpáticos, foram identificadas na regulação do sistema imunológico. Os nervos simpáticos que começaram a ser estudado nessa regulação foram os nervos esplâncnicos. Da porção torácica do tronco simpático, os nervos esplâncnicos se originam a partir da T5 e penetram na cavidade abdominal atravessando o diafragma através do trígono lombocostal. A exata origem e localização dos nervos esplâncnicos apresentam pequenas variações interespecie e intraespecíficas. Os nervos esplâncnicos maiores terminam nos gânglios celíacos, enquanto que os nervos esplâncnicos menores terminam nos gânglios aórtico-renal.^{74,75,76}

Em experimentos de Martelli et al., a atividade do nervo esplâncnico foi registrada durante 90 minutos durante endotoxemia, sendo fortemente ativado e promovendo um perfil de citocinas anti-inflamatório, ao reduzir TNF e aumentar IL-10^{77,78,79}. Inicialmente pensava-se que essa ação anti-inflamatória do nervo esplâncnico era principalmente associada à consequente ativação do nervo esplênico, que inibe a liberação excessiva de citocinas no baço, principal órgão relatado por mediar respostas inflamatórias ao LPS.^{80,78,79} Contudo, novos experimentos demonstraram que a influência do nervo esplâncnico é distribuída também em outros órgãos inervados por esses neurônios simpáticos,^{78,79} como o fígado, pâncreas e

estômago, intestino, e glândula adrenais⁸¹ (**Figura 5**). Nesse estudo os níveis plasmáticos de TNF foram medidos em ratos (previamente submetidos ou não à denervação esplâncnica) induzidos a endotoxemia com LPS. Posteriormente, as respostas dos animais foram comparadas após a remoção única ou combinada de órgãos inervados pelos nervos esplâncnicos. Com exceção dos animais nos quais todos os órgãos de interesse foram removidos, o TNF continuava a ser maior nos animais desnervados estimulado com LPS⁸¹ quando comparado ao animais que não sofreram a denervação. Sugere-se então que diferentes órgãos abdominais desempenham papéis complementares na mediação da modulação neural reflexa da inflamação sistêmica.

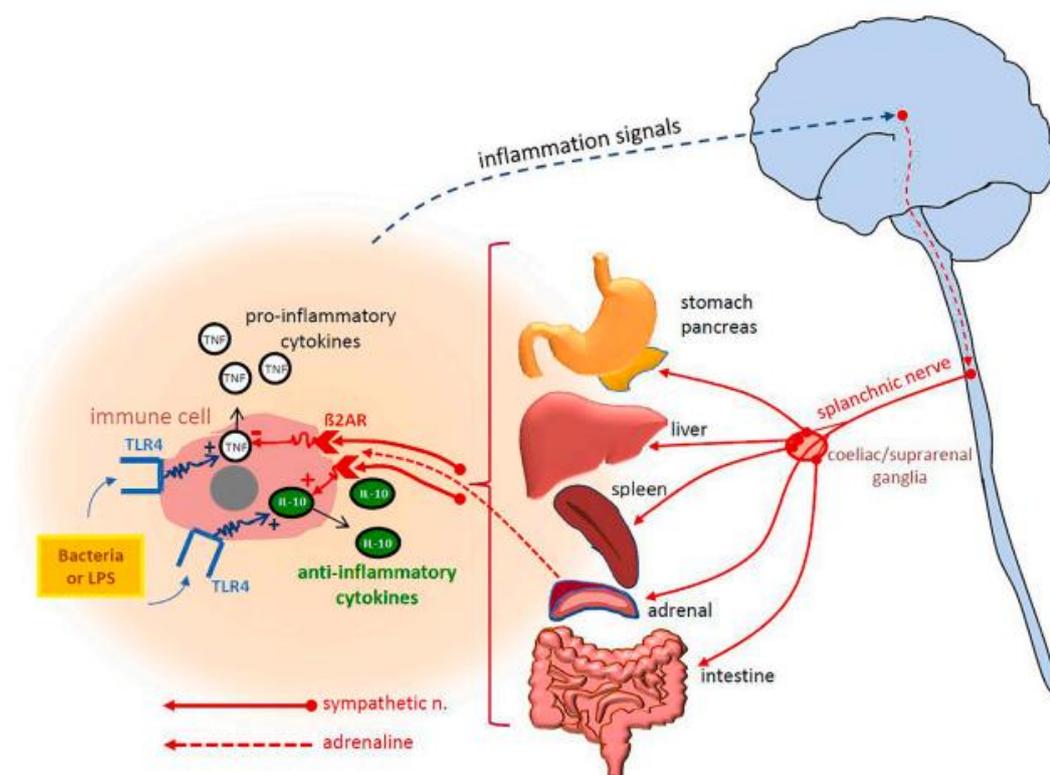


Figura 5. Diagrama mostrando o conceito atual do reflexo inflamatório. Abreviaturas: β2AR, receptor adrenérgico beta2; IL-10, interleucina 10; LPS, lipopolissacarídeo; TLR4, receptor toll-like 4; TNF, fator de necrose tumoral α. Os sinais positivos indicam ação excitatória, os sinais negativos, ação inibitória. Figura retirada de Martelli et al., 2021 (82).

Embora o estudo sobre o papel dos nervos autonômicos no reflexo inflamatório tenha sido vastamente explorado, a compreensão da influência desses nervos no combate a infecções propriamente ditas ainda são escassos, e sem análises da migração celular. Os grupos se restringem a modelos assépticos, com a indução de LPS i.v., e geralmente se limitam somente à medida de TNF (rápida liberação) como marcador inflamatório, com análises nas horas iniciais da inflamação. Para alcançar achados clinicamente relevantes é necessário a investigação do papel dos nervos autônomos em modelos sépticos, com a avaliação de

mediadores inflamatórios, analisando a atividade e recrutamento celular, e controle da infecção. Logo, visamos essas análises em nosso trabalho.

1.2.3. Inervação e receptores simpáticos nos órgãos e células imunes

Fibras simpáticas adrenérgicas eferentes inervam órgãos linfoides primários e secundários, incluindo medula óssea, timo, baço, linfonodos e tecido linfoides associados à mucosa^{60,83}. A inervação do baço é o mais bem caracterizado, sendo o nervo esplênico a via comum final de impulsos nervosos para o baço⁸³. Projeções neuronais se estendem ao longo da polpa vermelha e polpa branca, com terminações nas proximidades de linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas^{60,84,85}.

Após ser liberada nos terminais nervosos, a noradrenalina se liga a α - e β -receptores na superfície de células imunes, incluindo células dendríticas, macrófagos, granulócitos, linfócitos T e B, entre outras células^{60,83}. Entre os receptores adrenérgicos, o receptor β_2 -adrenérgico é o mais expresso entre as células imunes^{86,87}. Não obstante, as células imunes inatas expressam ambos os tipos de receptores adrenérgicos, sendo que a ativação dos receptores α_1 geralmente aumenta as funções efetoras e a ativação dos receptores β_2 suprimem^{88,60,89,90}. De acordo, a estimulação dos receptores β -adrenérgicos inibe a produção de TNF e IL-1 β , e estimula a produção de IL-10 nos macrófagos^{91,92,93}, enquanto a ativação de receptores α -adrenérgicos aumenta a atividade microbicida⁹⁴. Em neutrófilos os efeitos da ativação do receptor β -adrenérgico suprime a eficiência fagocítica e diminui o burst oxidativo^{95,96}. Dada esta diversidade de efeitos observados *in vitro*, fica evidente que estudos *in vivo* são necessários para definir quais dos efeitos possíveis são, de fato, relevantes no controle de infecções.

2. OBJETIVO

Este projeto visou determinar como que as ações imunomodulatórias do nervo esplâncnico impactam a capacidade do organismo de controlar a sepse em um modelo de peritonite induzida por *Escherichia coli* em ratos.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1. Confirmar a eficácia da denervação do nervo esplâncnico por meio de medidas de adrenalina plasmática.

2.1.2. Avaliar o efeito da denervação esplâncnica no clearance bacteriano no sítio primário (peritônio) e nos sítios secundários (baço e pulmão) da infecção.

2.1.3. Avaliar o efeito da denervação esplâncnica no infiltrado leucocitário na infecção generalizada.

2.1.4. Avaliar o efeito da denervação esplâncnica sobre marcadores de disfunção orgânica.

2.1.5. Analisar o efeito da denervação esplâncnica sobre citocinas pró- e anti-inflamatórias circulantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (peso médio 326 g) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (CEUA N 4754050718) para a realização dos experimentos. Os animais foram acondicionados em caixas com maravalha (4 animais/caixa) com água e ração *ad libitum* em sala com temperatura média de 26 °C e ciclo de claro/escuro (12:12 h). Após o procedimento cirúrgico até o final do experimento, cada rato ficou em caixa individual.

3.2. Cirurgia para denervação esplâncnica ou procedimento *Sham*

Uma semana antes do experimento, os ratos foram submetidos à cirurgia para a realização da denervação esplâncnica bilateral ou cirurgia simulada (*Sham*). Para tal procedimento, os animais foram anestesiados por sistema a gás contendo 5% de isoflurano em 1 L/min de oxigênio e mantidos em mesa cirúrgica com temperatura (37 °C) e volume de anestesia controlados (1,5 – 2,5% de isoflurano em 1 L/min de oxigênio). No início da cirurgia, todos os animais receberam injeção subcutânea do antibiótico Enrofloxacino (5 mg/kg), e ao final da cirurgia, do anti-inflamatório Cetoprofeno (5 mg/kg). Para a secção dos nervos esplâncnicos, utilizou-se de uma abordagem dorsolateral para a visualização da glândula suprarrenal, seguindo, a partir desta, a visualização do nervo esplâncnico, em direção à medula espinhal. Após a exposição do nervo esplâncnico, ele foi cortado na sua parte proximal. No procedimento *Sham*, realizou-se a mesma abordagem, porém sem a exposição e corte dos nervos.

3.3. Modelo e indução da sepse

Para a indução séptica, utilizamos um modelo de peritonite séptica monomicrobiana de *E. coli* (cepa ATCC 25992 obtida inicialmente pela profa. Elsa Masae Mamizuka – FCF/USP) que está sendo estabelecido pelo laboratório. Este modelo foi adaptado de um modelo prévio estabelecido pela Dra. Monique Fonseca no nosso laboratório. Tendo como base a curva de crescimento bacteriano padronizada⁹⁷, a fase de crescimento exponencial é entre 4 e 5 horas, com densidade ótica entre 0,7 a 0,9. Para preparar o inóculo que seria utilizado no dia da indução da sepse, uma alíquota da bactéria em meio líquido *Luria-Bertani (LB broth)* (que já havia sido previamente congelada) foi descongelada e 10 µL desta solução foi adicionada a 5 mL de meio *LB broth*. Esta solução foi incubada à 37 °C sob agitação

constante overnight. Em seguida, 1 mL dessa nova solução foi novamente adicionada a 4 mL de meio *LB broth* e incubada por 2 h à 37 °C sob agitação constante. Para calcular com precisão a quantidade de bactérias utilizada no enriquecimento da gaze, lemos a densidade óptica no espectrofotômetro no comprimento de onda 600 nm. O valor obtido foi adicionado a equação (**ANEXO D**), derivada da regressão linear previamente estabelecida pelo grupo de estudo. A partir da equação calculamos a quantidade de CFU/mL necessários para inocular a quantidade de bactéria que correspondesse à concentração de interesse.

Para a indução da sepse os ratos foram anestesiados como previamente relatado. Os ratos foram então submetidos a uma laparotomia medial, e os músculos da cavidade abdominal separados para a inserção de uma gaze, previamente autoclavada, enriquecida com *E. coli* na dose de 1×10^6 CFU/animal ou 1×10^4 CFU/animal de forma localizada, em um volume final de 0,5 ml.

3.4. Coleta de sangue e tecido

Após 6h ou 24h da indução da sepse, com o animal anestesiado conforme descrito anteriormente, as cavidades abdominal e torácica foram expostas para coleta de fluido e tecidos. O sangue venoso foi coletado com o auxílio de uma seringa e agulha 18G na veia cava inferior. Esse sangue foi colocado em tubo com heparina, e centrifugado para separação do plasma para posteriores dosagens de citocinas. Após a coleta do sangue, o pulmão esquerdo e cerca de 20% do baço (extremidade anterior) foram congelados em nitrogênio líquido. O pulmão direito, o restante do baço e a gaze foram coletados e colocados separadamente em tubos com PBS gelado. Essas amostras foram em seguida processadas para a determinação da carga bacteriana e para extração de células totais que posteriormente foram analisadas em citômetro de fluxo. A gaze foi utilizada para a análise referente ao sítio primário da infecção.

3.5. Dosagem de adrenalina plasmática

Para a detecção de adrenalina plasmática foi utilizado o Epinephrine/Norepinephrine ELISA Kit (ABNOVA, Taipé, Taiwan) seguindo o protocolo de ensaio da empresa. A colorimetria foi detectada em espectrofotômetro a 450 nm.

3.6. Determinação da carga bacteriana

A carga bacteriana foi determinada a partir do homogenato de pulmão e baço, e lavado da gaze de cada rato. Duzentos microlitros (200 µl) de cada amostra foram espalhados, com auxílio de alça drigalski, em ágar McConkey (seletivo para *E. coli*). Após 24 h de incubação à 37°C, foi contabilizado a quantidade de colônias que cresceram em cada placa. A quantidade

de Unidades Formadoras de Colônias por ml (CFU/ml) foi calculada levando em consideração a diluição, volume de material utilizado no plaqueamento e o número de colônias contabilizadas.

3.7. Análise fenotípica das células por citometria de fluxo

Para avaliar fenotipagem e infiltrado celular as células dos diferentes compartimentos (pulmão, baço e sítio infeccioso primário) obtidas dos animais infectados foram fixadas com Fixation buffer (*BD Biosciences, Oxford, UK*) por 20 min a 4°C no escuro, e em seguida lavadas com Wash buffer 1X e centrifugadas. Todo o protocolo utiliza a centrifugação a 600 g por 5 min a 4°C. As células foram ressuspensas com *Stain buffer (BD Biosciences, Oxford, UK)* e deixadas a 4°C até a marcação. No dia da marcação, após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram neutralizadas com *Stain buffer* e incubadas por 30 min a 4°C no escuro com anticorpos de superfície com diferentes fluorocromos: CD45/APC-Cy7 (*BD Biosciences, Oxford, UK*), e anti-RP1/PE (*BD Biosciences, Oxford, UK*). Após nova lavagem e centrifugação as células foram permeabilizadas para a marcação intracelular por 20 min a 4°C no escuro com *Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, Oxford, UK)*. Em seguida, as células foram lavadas com Wash buffer 1X, centrifugadas, e o sobrenadante descartado. As células foram então ressuspensas em *Stain buffer* e incubadas por 30 min a 4°C com o anticorpo anti-CD68/APC (*Novus Biologicals, Littleton, EUA*). Após nova lavagem e centrifugação as células foram ressuspensas com PBS e levadas para leitura no citômetro de fluxo *FACsCanto (BD Biosciences, Oxford, UK)*.

Foram adquiridos 50.000 eventos de cada amostra, as quais foram analisadas com o Software FlowJo v10.8.1. As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulidade (SSC), excluindo os restos celulares, seguindo para a análise da marcação CD45. Dentro do positivo para CD45, foram analisadas as marcações específicas para macrófagos e neutrófilos, CD68 e RP-1, respectivamente. Os leucócitos CD45⁺ CD68⁻ RP-1⁺ foram considerados neutrófilos, enquanto os leucócitos CD45⁺ CD68⁺ RP-1⁻ foram considerados macrófagos. A estratégia de gate para a identificação de macrófagos e neutrófilos é representada na **Figura 9**. Foi utilizada a mesma estratégia para a análise celular do sítio infeccioso primário (peritônio), baço, e pulmão de todos os animais.

3.8. Dosagem de citocinas

Para a detecção dos mediadores inflamatórios TNF, IL1-β, IL-6, e IL-10 no homogenato dos

pulmões, baço e lavado da gaze, foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA *sandwich*) padronizado (R&D, Littleton, USA). Para isso, o anticorpo de captura (1° Ac) foi diluído em PBS, plaqueado 50 µL/poço e incubado *overnight* à Ta. O excesso de anticorpo foi removido com PBS *Tween* (PBST). O bloqueio foi feito com PBS 1% BSA (300 µL/poço) e incubação por 1 h à TA. As amostras ou a curva padrão diluída de forma seriada (50 µL/poço) foram adicionadas após lavagens com PBST e incubadas por 2 h à temperatura ambiente. O anticorpo de detecção (2° Ac) foi adicionado e após 2 h de incubação e lavagens com PBST a Streptoavidina – HRP foi adicionada por 20 min à Ta no escuro. A colorimetria foi detectada em espectrofotômetro a 450 nm.

3.9. Análise estatística

Comparações estatísticas foram feitas com auxílio do programa *Statistica Advanced 8.0* (StatSoft) com nível de significância de 0,05. Foi utilizado Shapiro-Wilk para o teste de normalidade. Os dados de carga bacteriana (CFU) não são normalmente distribuídos (não paramétricos) e foram analisados pelo Teste de Mann-Whitney (comparações pareadas). Os outros parâmetros foram avaliados usando testes paramétricos: teste t de Student para comparações pareadas e análise de variância (ANOVA) para comparações múltiplas.

4. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados deste trabalho indicam que os nervos esplâncnicos deixam o hospedeiro menos agressivo na eliminação de uma infecção bacteriana, agindo principalmente no baço e no peritônio no caso do modelo de peritonite. Este fenótipo não foi decorrente de um aumento no infiltrado de neutrófilos e macrófagos, sugerindo, assim, uma modulação neural direta da atividade microbicida. É possível que os nervos esplâncnicos, por reduzir a intensidade da resposta imune, sirvam o propósito de minimizar o dano tecidual na sepse. Entretanto, tal propósito não foi revelado no contexto dos nossos experimentos, que tiveram enfoque na fase mais inicial da peritonite séptica.

REFERÊNCIAS

1. Funk, D. J., Parrillo, J. E. & Kumar, A. Sepsis and Septic Shock: A History. *Crit. Care Clin.* **25**, 83–101 (2009).
2. Salomão, R. *et al.* Sepsis: Evolving concepts and challenges. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **52**, 1–14 (2019).
3. Chiu, C. & Legrand, M. Epidemiology of sepsis and septic shock. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **34**, 71–76 (2021).
4. Fleischmann-Struzek, C. *et al.* Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* **46**, 1552–1562 (2020).
5. Almeida, N. R. C., *et al.* Analysis of trends in sepsis mortality in Brazil and by regions from 2010 to 2019. *Rev Saude Publica* 68–68 (2022) doi:10.29289/259453942021v31s2068.
6. Singer, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **315**, 801–810 (2016).
7. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* **39**, 165–228 (2013).
8. Levy, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* **29**, 530–538 (2003).
9. Ackerman, M. H., Ahrens, T., Kelly, J. & Pontillo, A. Sepsis. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* **33**, 407–418 (2021).
10. Khilnani, P. Severe sepsis and septic shock. *ICU Protoc. A Stepwise Approach* 703–707 (2012) doi:10.1007/978-81-322-0535-7_88.
11. Denstaedt, S. J., Singer, B. H. & Standiford, T. J. Sepsis and nosocomial infection: Patient characteristics, mechanisms, and modulation. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
12. JL, V. *et al.* International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *Jama* **302**, 2323–2329 (2009).
13. Abe, R. *et al.* Gram-negative bacteremia induces greater magnitude of inflammatory response than Gram-positive bacteremia. *Crit. Care* **14**, (2010).
14. Bertani, B. & Ruiz, N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* **8**, 1–33 (2018).
15. Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N. & Sannomiya, P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock* **30**, 53–59 (2008).
16. Bone, R. C. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med.* **115**, 457–469 (1991).
17. Cerami A, Ikeda Y, Trang N, Hotez P, B. B. WEIGHT LOSS ASSOCIATED WITH AN ENDOTOXIN-INDUCED MEDIATOR FROM PERITONEAL MACROPHAGES: THE ROLE OF CACHECTIN (TUMOR NECROSIS FACTOR). *Immunol. Lett.* **11**, 173–177 (1985).
18. Marshall, J. C. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol. Med.* **20**, 195–203 (2014).
19. Huang, M., Cai, S. & Su, J. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).

20. Patil, N. K., Guo, Y., Luan, L. & Sherwood, E. R. Targeting immune cell checkpoints during sepsis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–24 (2017).
21. Delano, M. J. & Ward, P. A. Sepsis-induced immune dysfunction: Can immune therapies reduce mortality? *J. Clin. Invest.* **126**, 23–31 (2016).
22. Han, J. & Ulevitch, R. J. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat. Immunol.* **6**, 1198–1205 (2005).
23. Henson, P. M. Dampening Inflammation Nature. *Nat. Immunol.* **6**, 1179–1181 (2005).
24. Germolec, D. R., Shipkowski, K. A., Frawley, R. P. & Evans, E. Markers of inflammation. *Methods Mol. Biol.* **1803**, 57–79 (2018).
25. Guilliams, M., Lambrecht, B. N. & Hammad, H. Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunol.* **6**, 464–473 (2013).
26. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, M. A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunol.* **31**, (2013).
27. Cronkite, D. A. & Strutt, T. M. The regulation of inflammation by innate and adaptive lymphocytes. *J. Immunol. Res.* **2018**, (2018).
28. Català, C. *et al.* Innate immune response to peritoneal bacterial infection. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **371**, 43–61 (2022).
29. Kelly, M., Hwang, J. M. & Kubes, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 3–10 (2007).
30. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
31. Sônego, F., Alves-Filho, J. C. & Cunha, F. Q. Targeting neutrophils in sepsis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 1019–1028 (2014).
32. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 762–774 (2011).
33. Kubes, P. & Ward, P. A. Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathol.* **10**, 127–135 (2000).
34. Kadomoto, S., Izumi, K. & Mizokami, A. Macrophage Polarity and Disease Control. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
35. Fujiwara, N. & Kobayashi, K. Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **4**, 281–286 (2005).
36. Murray, P. J., Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *J. Med. Assoc. Thai.* **11**, 723–737 (2012).
37. Borregaard, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
38. Sheppard, F. R. *et al.* Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1025–1042 (2005).
39. Manda-Handzlik, A. & Demkow, U. Neutrophils: The role of oxidative and nitrosative stress in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **857**, 51–60 (2015).
40. Saini, R., Azam, Z., Sapra, L. & Srivastava, R. K. Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) in

- Neutrophils: An Insight. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **180**, 49–83 (2021).
41. Papayannopoulos, V. & Zychlinsky, A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* **30**, 513–521 (2009).
 42. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231–241 (2007).
 43. Prame Kumar, K., Nicholls, A. J. & Wong, C. H. Y. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell Tissue Res.* **371**, 551–565 (2018).
 44. Brown, K. *et al.* Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* **368**, 157–169 (2006).
 45. Carl Nathan. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846–852 (2002).
 46. Goodman, W. A., Cooper, K. D., McCormick, T. S. Regulation Generation: The Suppressive Functions of HUMAN Regulatory T Cells. *Crit. Rev. Immunol.* **32**, 65–79 (2012).
 47. Kryczek, I. *et al.* Cutting Edge: Induction of B7-H4 on APCs through IL-10: Novel Suppressive Mode for Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **177**, 40–44 (2006).
 48. Thornton, A. M. & Shevach, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188**, 287–296 (1998).
 49. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. & Hafler, D. A. FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 490–500 (2010).
 50. Vandewalle, J. & Libert, C. Glucocorticoids in Sepsis: To Be or Not to Be. *Front. Immunol.* **11**, 1–14 (2020).
 51. Ramachandra, R. N., Sehon, A. H. & Berczi, I. Neuro-hormonal host defence in endotoxin shock. *Brain Behav. Immun.* **6**, 157–169 (1992).
 52. Bertini, R., Bianchi, M. & Ghezzi, P. Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **167**, 1708–1712 (1988).
 53. Kasahara, E. & Inoue, M. Cross-talk between HPA-axis-increased glucocorticoids and mitochondrial stress determines immune responses and clinical manifestations of patients with sepsis. *Redox Rep.* **20**, 1–10 (2015).
 54. Bellavance, M. A. & Rivest, S. The HPA - immune axis and the immunomodulatory actions of glucocorticoids in the brain. *Front. Immunol.* **5**, 1–13 (2014).
 55. Barha, C. K., Nagamatsu, L. S. & Liu-Ambrose, T. *Basics of neuroanatomy and neurophysiology. Handbook of Clinical Neurology* vol. 138 (Elsevier B.V., 2016).
 56. Bergström, R. M. Physiology of the Autonomic Nervous System. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **8**, 17–20 (1964).
 57. JÜNEMANN, K. -P, PERSSON-JÜNEMANN, C., LUE, T. F., TANAGHO, E. A. & ALKEN, P. Neurophysiological Aspects of Penile Erection: the Role of the Sympathetic Nervous System. *Br. J. Urol.* **64**, 84–92 (1989).
 58. Smith, P. G., Warn, J. D., Steinle, J. J., Krizsan-Agbas, D. & Hasan, W. Modulation of parasympathetic neuron phenotype and function by sympathetic innervation. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **96**, 33–42 (2002).
 59. Tracey, K. J. The inflammatory reflex. *Nature* **420**, 853–859 (2002).
 60. Bellinger, D. L. & Lorton, D. Autonomic regulation of cellular immune function. *Auton.*

- Neurosci. Basic Clin.* **182**, 15–41 (2014).
61. Borovikova, L. V *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **405**, (2000).
 62. Ghia, J. E., Blennerhassett, P. & Collins, S. M. Vagus nerve integrity and experimental colitis. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, 560–567 (2007).
 63. Rosas-ballina, M. *et al.* Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science (80-.)*. **334**, 98–102 (2011).
 64. Rosas-Ballina, M. *et al.* Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11008–11013 (2008).
 65. Pavlov, V. A. & Tracey, K. J. *Neural circuitry and immunity. Immunologic Research* vol. 63 (2015).
 66. Andersson, U. & Tracey, K. J. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J. Exp. Med.* **209**, 1057–1068 (2012).
 67. Andersson, U. & Tracey, K. J. Reflex Principles of Immunological Homeostasis. **30**, 313–335 (2012).
 68. Koopman, F. A. *et al.* Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in Rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 8284–8289 (2016).
 69. Bonaz, B., Sinniger, V. & Pellissier, S. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *J. Physiol.* **594**, 5781–5790 (2016).
 70. Hoover, D. B. Cholinergic Modulation of the Immune System Presents New Approaches for Treating Inflammation. *Pharmacol Ther.* **179**, 1–16 (2018).
 71. Lubbers, T. *et al.* Lipid-enriched enteral nutrition controls the inflammatory response in murine Gram-negative sepsis. *Crit. Care Med.* **38**, 1996–2002 (2010).
 72. Huston, J. M. *et al.* Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis. *Crit. Care Med.* **35**, 2762–2768 (2007).
 73. Huston, J. M. The vagus nerve and the inflammatory reflex: Wandering on a new treatment paradigm for systemic inflammation and sepsis. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **13**, 187–193 (2012).
 74. Gest, T. R. & Hildebrandt, S. The pattern of the thoracic splanchnic nerves as they pass through the diaphragm. *Clin. Anat.* **22**, 809–814 (2009).
 75. Loukas, M. *et al.* A review of the thoracic splanchnic nerves and celiac ganglia. *Clin. Anat.* **23**, 512–522 (2010).
 76. Yang, H. J., Gil, Y. C., Lee, W. J., Kim, T. J. & Lee, H. Y. Anatomy of thoracic splanchnic nerves for surgical resection. *Clin. Anat.* **21**, 171–177 (2008).
 77. Xuefeng Chen, *et al.*, 2011. Vagal afferent activation suppresses systemic inflammation via the splanchnic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun.* **73**, 441–449 (2018).
 78. Martelli, D., Yao, S. T., Mckinley, M. J. & Mcallen, R. M. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. *J. Physiol.* **592**, 1677–1686 (2014).
 79. Martelli, D., Yao, S. T., Mancera, J., McKinley, M. J. & McAllen, R. M. Reflex control of inflammation by the splanchnic anti-inflammatory pathway is sustained and independent of anesthesia. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, R1085–R1091 (2014).
 80. Martelli, D., Farmer, D. G. S. & Yao, S. T. The splanchnic anti-inflammatory pathway: could it

- be the efferent arm of the inflammatory reflex? *Exp. Physiol.* **101**, 1245–1252 (2016).
81. Martelli, D., Farmer, D. G. S., McKinley, M. J., Yao, S. T. & McAllen, R. M. Anti-inflammatory reflex action of splanchnic sympathetic nerves is distributed across abdominal organs. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **316**, R235–R242 (2019).
 82. McAllen, R. M., McKinley, M. J. & Martelli, D. Reflex regulation of systemic inflammation by the autonomic nervous system. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **237**, 102926 (2022).
 83. Nance, D. M., Sanders, V. M. Autonomic Innervation and Regulation of the Immune System. *Brain Behav Immun.* **21**, 736–745 (2007).
 84. Straub, R. H. Complexity of the bi-directional neuroimmune junction in the spleen. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 640–646 (2004).
 85. Felten, D. L., Ackerman, K. D., Wiegand, S. J. & Felten, S. Y. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: I. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. *J. Neurosci. Res.* **18**, 28–36 (1987).
 86. Kin, N. W. It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 1093–1104 (2006).
 87. Yamaguchi, M., Hirai, K., Ohta, K., Ito, K. & Morita, Y. A beta2-agonist, procaterol, inhibits basophil migration. *J. Asthma* **32**, 125–130 (1995).
 88. Zurier, R. B., Weissmann, G., Hoffstein, S., Kammerman, S. & Tai, H. H. Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. II. Effects of cAMP and cGMP, autonomic agonists, and agents which affect microtubule function. *J. Clin. Invest.* **53**, 297–309 (1974).
 89. Benschop, R. J., Rodriguez-Feuerhahn, M. & Schedlowski, M. Catecholamine-induced leukocytosis: Early observations, current research, and future directions. *Brain. Behav. Immun.* **10**, 77–91 (1996).
 90. Benschop, R. J., Schedlowski, M., Wienecke, H., Jacobs, R. & Schmidt, R. E. Adrenergic control of natural killer cell circulation and adhesion. *Brain. Behav. Immun.* **11**, 321–332 (1997).
 91. Van Poll, T. Der & Lowry, S. F. Epinephrine inhibits endotoxin-induced IL-1 β production: Roles of tumor necrosis factor- α and IL-10. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **273**, 1885–1890 (1997).
 92. Van der Poll, T., Jansen, J., Endert, E., Sauerwein, H. P. & Van Deventer, S. J. H. Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect. Immun.* **62**, 2046–2050 (1994).
 93. Hetier, E., Ayala, J., Bousseau, A., Prochiantz, A. Modulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression by β -adrenergic agonists in mouse ameboid microglial cells. *Exp Brain Res* **86**, 407–413 (1991).
 94. Miles, B. A., Lafuse, W. P. & Zwillling, B. S. Binding of α -adrenergic receptor stimulates the anti-mycobacterial activity of murine peritoneal macrophages. *J. Neuroimmunol.* **71**, 19–24 (1996).
 95. Gosain, A., Gamelli, R. L., DiPietro, L. A. Norepinephrine-mediated Suppression of Phagocytosis by Wound Neutrophils. *J Surg Res* **152**, 311–318 (2009).
 96. Gibson-Berry, K. L., Whitin, J. C. & Cohen, H. J. Modulation of the respiratory burst in human neutrophils by isoproterenol and dibutyryl cyclic AMP. *J. Neuroimmunol.* **43**, 59–68 (1993).
 97. FONSECA, M. T. ; KOMEAGAE, E. N. ; FLATOW, E. A. ; STEINER, A. A. A novel animal model of monobacterial sepsis: the importance of priming with a viral mimetic.. In: XXXIX

- Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2014, Buzios, RJ. Anais do XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2014. p. 508.
98. Guérineau, N. C. Cholinergic and peptidergic neurotransmission in the adrenal medulla: A dynamic control of stimulus-secretion coupling. *IUBMB Life* **72**, 553–567 (2020).
 99. Ngo, N., Patel, K., Isaacson, P. G., Naresh, K. N. Leucocyte common antigen (CD45) and CD5 positivity in an “undifferentiated” carcinoma: a potential diagnostic pitfall. *J. Clin. Pathol.* **60**, 936–938 (2006).
 100. Škrajnar, Š., Lasnik, M. A. & Zavec, A. B. A flow cytometric method for determination of the blood neutrophil fraction in rats. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **48**, 152–156 (2009).
 101. STROBL, H., SCHEINECKER, C., CSMARITS, B., MAJDIC, O. & KNAPP, W. Flow cytometric analysis of intracellular CD68 molecule expression in normal and malignant haemopoiesis. *Br. J. Haematol.* **90**, 774–782 (1995).
 102. Kunisch, E. *et al.* Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 774–784 (2004).
 103. Woreta, T. A. & Alqahtani, S. A. Evaluation of abnormal liver tests. *Med. Clin. North Am.* **98**, 1–16 (2014).
 104. Ismail, O. Z. & Bhayana, V. Lipase or amylase for the diagnosis of acute pancreatitis? *Clin. Biochem.* **50**, 1275–1280 (2017).
 105. Lima, C. & Macedo, E. Urinary biochemistry in the diagnosis of acute kidney injury. *Dis. Markers* **2018**, (2018).
 106. Komegae, E. N. *et al.* Vagal afferent activation suppresses systemic inflammation via the splanchnic anti-inflammatory pathway. *Brain. Behav. Immun.* **73**, 441–449 (2018).
 107. McKinley, M. J., Martelli, D., Trevizan-Baú, P. & McAllen, R. M. Divergent splanchnic sympathetic efferent nerve pathways regulate interleukin-10 and tumour necrosis factor- α responses to endotoxaemia. *J. Physiol.* **600**, 4521–4536 (2022).
 108. Lincourt, A. E. *et al.* Retained Foreign Bodies After Surgery. *J. Surg. Res.* **138**, 170–174 (2007).
 109. Access, O. Research article Retained sponge after abdominal surgery : experience from a third world country. **8688**, 4–10 (2009).
 110. Susmallian, S., Raskin, B. & Barnea, R. Surgical sponge forgotten for nine years in the abdomen: A case report. *Int. J. Surg. Case Rep.* **28**, 296–299 (2016).
 111. Sawyer, R. G. *et al.* Trial of Short-Course Antimicrobial Therapy for Intraabdominal Infection. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1996–2005 (2015).
 112. Fonseca, M. T. *et al.* A leukotriene-dependent spleen-liver axis drives TNF production in systemic inflammation. *Sci. Signal.* **14**, (2021).
 113. Scanzano, A. & Cosentino, M. Adrenergic regulation of innate immunity : a review. **6**, (2015).
 114. Lankadeva, Y. R. *et al.* Sympathetic nerves control bacterial clearance. *Sci. Rep.* **10**, 1–8 (2020).
 115. Panday, R. S. N., Lammers, E. M. J., Alam, N. & Nanayakkara, P. W. B. An overview of positive cultures and clinical outcomes in septic patients : a sub- analysis of the Prehospital Antibiotics Against Sepsis (PHANTASi) trial. 1–9 (2019).

116. Kethireddy, S. *et al.* Culture-Negative Septic Shock Compared With Culture-Positive Septic Shock: A Retrospective Cohort Study. **46**, (2018).
117. Gupta, S., Sakhuja, A., Kumar, G., Mcgrath, E. & Nanchal, R. S. Culture-Negative Severe Sepsis. *Chest* **150**, 1251–1259 (2016).
118. Esper AM, Moss M, Lewis CA, Nisbet R, Mannino DM, M. G. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit Care Med.* 2006 **34**, 2576–2582 (2006).
119. Blanco, J. *et al.* Incidence , organ dysfunction and mortality in severe sepsis : a Spanish multicentre study. **12**, 1–14.
120. Rhee, C., Gohil, S., Klompas, M., Pilgrim, H. & Care, H. Regulatory mandates for sepsis care:- reasons for caution. **370**, 1673–1676 (2014).
121. Hecker, A. *et al.* Intra-abdominal sepsis : new definitions and current clinical standards World Society of Emergency Surgeons. 257–271 (2019).
122. Panes J., G. D. N. Leukocyte-Endothelial Cell Interactions: Molecular Mechanisms and Implications in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterology* **114**, 1066–1090 (1998).
123. Balkwill, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 135–141 (2002).
124. Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* **214**, 149–160 (2008).
125. Bartzeliotou, A. I. *et al.* Circulating levels of adhesion molecules and markers of endothelial activation in acute inflammation induced by prolonged brisk exercise. *Clin. Biochem.* **40**, 765–770 (2007).
126. Koh, Y. & Park, J. Cell adhesion molecules and exercise. *J. Inflamm. Res.* **11**, 297–306 (2018).
127. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
128. Kurihara, T., Warr, G., Loy, J. & Bravo, R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* **186**, 1757–1762 (1997).
129. Shilov, J. I. & Orlova, E. G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. *Immunol. Lett.* **86**, 229–233 (2003).
130. Silvestri, M., Oddera, S., Lantero, S. & Rossi, G. A. β 2-agonist-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is not associated with modification of LFA-1 and Mac-1 expression or with impairment of polymorphonuclear leukocyte antibacterial activity. *Respir. Med.* **93**, 416–423 (1999).
131. Mart, L., Isabel, G. & Ortega, E. Microbicide Capacity of Macrophages from Obese and Lean Mice : E f f ects of Exercise.
132. Opdahl, H., Benestad, H. B. & Nicolaysen, G. Effect of β -Adrenergic Agents on Human Neutrophil Granulocyte Activation with N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and Phorbol Myristate Acetate. *Pharmacol. Toxicol.* **72**, 221–228 (1993).
133. Ojeda Ojeda, M. *et al.* Temporal trends of circulating nitric oxide and pro-inflammatory cytokine responses ex vivo in intra-abdominal sepsis: Results from a cohort study. *Inflamm. Res.* **60**, 289–297 (2011).
134. Santos, S. S. *et al.* Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock* **38**, 18–23 (2012).

135. Rossaint, J. & Zarbock, A. Pathogenesis of multiple organ failure in sepsis. *Crit. Rev. Immunol.* **35**, 277–291 (2015).
136. Szabó, C. & Módis, K. Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock. *Shock* **34**, 4–14 (2010).
137. Mayr, E. The objects of selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2091–2094 (1997).
138. Lopez-Castejon, G. & Brough, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 189–195 (2011).
139. Sahoo, M., Ceballos-Olvera, I., Del Barrio, L. & Re, F. Role of the inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in bacterial infections. *ScientificWorldJournal.* **11**, 2037–2050 (2011).

ANEXOS

ANEXO A – SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA

SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica)

Dois ou mais de:

- Temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$
- Frequência cardíaca $>90/\text{min}$
- Frequência respiratória $>20/\text{min}$ ou $\text{PaCO}_2 <32$ mmHg
- Contagem de leucócitos $>12000/\text{mm}^3$ ou $<4000/\text{mm}^3$

Critérios SIRS. Adaptado do comunicado oficial Sepsis-3.

ANEXO B – DEFINIÇÃO DE SEPSE E SUAS SUBDIVISÕES

SIRS	Temperatura >38°C ou <36°C Frequência cardíaca >90/min Frequência respiratória >20/min ou PaCO ₂ <32 mmHg Contagem de leucócitos >12000/mm ³ ou <4000/mm ³
Sepse	Dois ou mais critérios SIRS Forte suspeita de infecção como causa subjacente
Sepse grave	Sepse associada a disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão
Choque séptico	Sepse grave com hipotensão apesar da ressuscitação volêmica adequada, juntamente com a presença de anormalidades de perfusão que podem incluir, mas não estão limitadas a, acidose láctica, oligúria ou uma alteração aguda no estado mental

Definição de seps e suas subdivisões. Adaptado de Legrand and Chiu.

ANEXO C – PONTUAÇÃO DE AVALIAÇÃO SEQUENCIAL DE FALHA DE ÓRGÃOS RELACIONADA À SEPSE

Pontuação Sistema	0	1	2	3	4
Respiração					
PaO ₂ /FIO ₂ , mm Hg	≥400	<400	<300	<200 c/ suporte respiratório	<100 c/ suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Fígado					
Bilirrubina, mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
Cardiovascular					
	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamina <5 ou dobutamina (μg/kg/min)	Dopamina 5.1-15 ou epinefrina ≤0.1 ou norepinefrina ≤0.1	Dopamina >15 ou epinefrina >0.1 ou norepinefrina >0.1
Sistema nervoso central					
Pontuação Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinina, mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 ou diurese	>5.0 ou diurese

Pontuação de Avaliação Sequencial de Falha de Órgãos (Relacionada à Sepsis). Adaptado do comunicado oficial Sepsis-3.

ANEXO D – EQUAÇÃO PARA CÁLCULO DA CONCENTRÇÃO DE *E. COLI*

$$y = a + b.x$$

Onde $y = \log\text{CFU}$

$a = \text{coeficiente linear} = 6,74$

$b = \text{coeficiente angular} = 3,041$

$x = \text{densidade ótica}$