

Ricardo Costa Petroni

**Papel da solução salina hipertônica (NaCl 7,5%)
no remodelamento pulmonar da endotoxemia
induzida por lipopolissacarídeos**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Petroni, Ricardo Costa

Papel da solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) no remodelamento pulmonar da endotoxemia induzida por lipopolissacarídeos / Ricardo Costa Petroni. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Sepse 2.Lesão pulmonar aguda 3.Inflamação 4.Solução salina hipertônica 5.Fibrose pulmonar 6.Síndrome do desconforto respiratório do adulto 7.Colágeno 8.Endotoxemia 9.Lipopolissacarídeos 10.Ratos

USP/FM/DBD-308/13

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Guia de apresentação e dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Cordeiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2012

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List Journals Indexed in Index Medicus*.

Dedicatória

*Aos meus pais por todo apoio,
ensinamentos e compreensão,
sem os quais não seria possível
realizar essa tese.*

Agradecimentos

Ao Professor Francisco Garcia Soriano pela orientação, apoio, confiança, dedicação e amizade, que foram primordiais para a realização dessa tese.

Aos meus Pais e meus Irmãos Rosana, Reinaldo, Renan e Rodrigo por todo apoio e compreensão.

Aos meus Avós, Tios e Primos sempre presentes em minha vida.

À Denise, Hermes e Suely que me acolheram quando ainda estava na iniciação científica e foram meus grandes professores tendo um papel fundamental para a realização dessa tese.

À Thais que além da amizade e ensinamentos tornou a realização dessa tese muito mais animada.

À Ester e Vivian por sempre se mostrarem dispostas a ajudar, pelo companheirismo e amizade.

Aos Professores Dr. Heraldo Possolo de Souza e Dr. Irineu Tadeu Velasco, pelas sugestões que contribuíram para realização desta tese.

Ao Dr. Paolo Biselli pela imensa contribuição na realização dos experimentos e pela discussão dos resultados obtidos.

Aos amigos e funcionários do LIM-51: Geraldo, Kelli e Fátima que ajudaram diretamente para a realização dessa tese.

Aos amigos e alunos do LIM-51: Rosangela, Clara, Joleen, Isabela, Anne, Vanessa, Mariana Macedo, Mariana Maldonado, Mariana Theobaldo, Darkiane, Graça, Luis e todos os outros que passaram pelo laboratório, por toda ajuda.

À FAPESP pelo suporte financeiro

*“Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução	33
1.1 - Sepse: Clínica e Epidemiologia.....	33
1.2 - Fisiopatologia da Sepse e da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS).....	35
1.3 - Mecanismos Moleculares de Ação do LPS	35
1.4 – Mediadores Inflamatórios	37
1.5 - Pulmão e Sepse.....	38
1.6 – Fibrose Pulmonar	39
1.7 – Metaloproteinases (MMPs).....	41
1.8 - Óxido Nítrico	43
1.9 – Ressuscitação Volêmica	44
1.10 - Solução Hipertônica – NaCl 7,5% (SH).....	44
2. Objetivos	49
2.1 – Objetivo Geral:	49
2.2 – Objetivos Específicos:	49
3. Métodos.....	53
3.1- Modelo Biológico	53
3.2 - Anestesia	53
3.3 - Tempo de Estudo.....	53
3.4 - Constituição dos Grupos e Protocolo Experimental	54
3.5 - Curva de Sobrevida.....	55
3.6 - Determinação de Edema Pulmonar	55

3.7 - Análise da Função Pulmonar	55
3.8 - Quantificação de Expressão Gênica	56
3.8.1- Extração de RNA.....	56
3.8.2 - Reação de PCR em tempo real	57
3.9 - Análise da Atividade da Metaloproteinase-9 (MMP-9) – Zimografia	58
3.10 - Quantificação de Citocinas - ELISA	59
3.11 - Análise da Expressão Proteica – Western Blot.....	60
3.12 - Quantificação de Nitrito – Reação de Griess	61
3.13 - Cultura de fibroblastos	62
3.13.1 - Estímulo dos fibroblastos com LPS e solução hipertônica.....	62
3.14 - Análise estatística	63
4. Resultados	67
4.1 - Resultados dos animais tratados após 15 minutos da injeção de LPS .	67
4.1.1 - Curva de Mortalidade	67
4.1.2 - Edema Pulmonar.....	68
4.1.3 - Produção de Mediadores Inflamatórios.....	68
4.1.4 - Expressão Gênica de Metaloproteinase 9 (MMP-9).....	70
4.1.5 - Atividade da Metaloproteinase 9 (MMP 9)	71
4.1.6 - Expressão Proteica de Colágeno Tipo I e Tipo III	72
4.1.7 - Função Pulmonar.....	74
4.1.8 - Ativação da FAK.....	75
4.1.9 - Ação da solução hipertônica na via da FAK.....	76
4.1.10 - Ação da solução hipertônica na síntese de óxido nítrico.....	78
4.2 – Resultados dos animais tratados após 1,5 horas da injeção de LPS...	79
4.2.1 - Curva de Mortalidade	79
4.2.2 - Edema Pulmonar.....	80
4.2.3 - Produção de Mediadores Inflamatórios.....	81

4.2.4 - Expressão Gênica de Metaloproteinase 9 (MMP-9).....	83
4.2.5 - Atividade da Metaloproteinase 9 (MMP 9)	84
4.2.6 - Expressão Proteica de Colágeno Tipo I e Tipo III	84
4.2.7 - Função Pulmonar.....	86
4.2.8 - Ativação da FAK.....	87
4.2.9 - Ação do tratamento tardio com solução hipertônica na síntese de óxido nítrico	88
5. Discussão.....	93
5.2 - Efeitos do tratamento precoce com solução hipertônica.....	94
5.3 - Efeitos do tratamento tardio com solução hipertônica.....	102
6. Conclusões.....	109
7. Rereferências	113

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

BSA	do inglês “ <i>Bovine Serum Albumin</i> ” traduzido por Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	íon Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CD	do inglês “ <i>Cluster of differentiation</i> ” traduzido por Conjuntos de diferenciação
eNOS	do inglês “ <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> ” traduzido por Óxido nítrico sintase endotelial
FAK	do inglês “ <i>Focal Adhesion Kinase</i> ” traduzido por Quinase de adesão focal
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	do inglês “ <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> ” traduzido por Óxido nítrico sintase induzida
LA	Lipídeo A
LBP	do inglês “ <i>Lipopolysaccharide binding protein</i> ” traduzido por Proteína ligante de LPS
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	do inglês “ <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> ” traduzido por Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz Extracelular
MG	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetros cúbicos
mmHg	Milímetros de Mercúrio
MMP	do inglês “ <i>Matrix Metalloproteinases</i> ” traduzido por Metaloproteinase de matriz
NaCl	Cloreto de Sódio

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaN ₃	Azida Sódica
nM	Nanometros
NOS	do inglês " <i>Nitric Oxide Synthase</i> " traduzido por Óxido nítrico sintase
PAF	do inglês " <i>Platelet Activating Factor</i> " traduzido por Fator ativador de plaquetas
pCO ₂	Pressão Parcial de CO ₂
pFAK	do inglês " <i>Phosphorilated Focal Adhesion Kinase</i> " traduzido por Quinase de adesão focal fosforilada
pg	Picogramas
PGE2	Prostaglandina E2
PMSF	do inglês " <i>Tris-Buffered Saline Tween 20</i> " traduzido por Tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20
pO ₂	Pressão parcial de Oxigênio
RNA	do inglês " <i>Ribonucleic acid</i> " traduzido por Ácido ribonucleico
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SDS	do inglês " <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> " traduzido por Sulfato dodecil sódico
SDS-PAGE	do inglês " <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis</i> " traduzido por Eletroforese em gel de poliacrilamida, tendo como agente denaturante sulfato dodecil sódico
SH	Solução Hipertônica
SIRS	do inglês " <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> " traduzido por Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TEMED	Tetrametiletilenonodiamino
TGF-β	do inglês " <i>Transforming Growth Factor</i> "
TIMP	do inglês " <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i> " traduzido por Inibidor tecidual de metaloproteinases
TNF	do inglês " <i>Tumor Necrosis Factor</i> " traduzido por Fator de necrose tumoral
TXA2	Tromboxano A2
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

μg Micrograma

μL Microlitro

Zn^{2+} íon Zinco

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

Figura 1. Vias de sinalização celular deflagrados pelo LPS.....	36
Figura 2. Esquema do respirador para pequenos animais.....	56
Figura 3. Sobrevida de ratos tratados precocemente.....	67
Figura 4. Edema pulmonar animais tratados precocemente.	68
Figura 5. Quantificação citocinas animais tratados precocemente.....	69
Figura6.Expressão gênica no pulmão de MMP-9 animais tratados precocemente.....	70
Figura 7. Atividade da MMP-9 animais tratados precocemente	71
Figura 8. Expressão proteica no pulmão de colágenos tipo I e Tipo III animais tratados precocemente.....	73
Figura 9. Avaliação da resistência e elastância do tecido pulmonar de animais tratados precocemente.....	75
Figura 10. Atividade de FAK no tecido pulmonar de animais tratados precocemente.....	76
Figura 11. Atividade de FAK em cultura celular de fibroblastos.	77
Figura 12. Expressão gênica no pulmão de iNOS e quantificação de nitrito no plasma de animais tratados precocemente	79
Figura 13. Sobrevida de ratos tratados tardiamente	80
Figura 14. Edema pulmonar animais tratados tardiamente.....	81
Figura 15. Quantificação de citocinas animais tratados tardiamente.	82
Figura16. Expressão gênica no pulmão de MMP-9 animais tratados tardiamente	83
Figura 17. Atividade de MMP-9 no pulmão animais tratados tardiamente	84
Figura 18. Expressão proteica no pulmão de colágeno tipo I e colágeno tipo III animais tratados tardiamente	86
Figura 19. Avaliação da função pulmonar animais tratados tardiamente.	87
Figura 20. Atividade de FAK no pulmão animais ttratdos tardiamente.....	88
Figura 21. Expressão gênica no pulmão de iNOS e quantificação de nitrito no plasma animais tratados tardiamente.....	89

RESUMO

Resumo

Petroni, RC. Papel da solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) no remodelamento pulmonar da endotoxemia induzida por lipopolissacarídeos. [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Sepse é uma resposta inflamatória inapropriada desencadeada pela presença de bactérias e/ou produtos bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS). A sepse grave e o choque séptico estão associados a taxas de mortalidade de 40 a 60%. A falência respiratória está entre as mais frequentes complicações da sepse grave, ocorrendo em quase 80% dos casos. Cerca de 40% dos pacientes com sepse desenvolvem a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), caracterizada principalmente pela alteração da função respiratória, surgimento de edema intersticial pulmonar e deposição de colágeno nos pulmões. Embora a reposição volêmica seja normalmente utilizada em pacientes sépticos, não há consenso quanto ao volume a ser administrado, sendo atualmente recomendada a utilização de pequenos volumes. Neste contexto, a solução salina hipertônica (NaCl 7,5%, SH) tem sido apresentada como um potencial agente terapêutico. Visando contribuir para o conhecimento dos benefícios da solução salina hipertônica (SH) na sepse, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação do tratamento precoce e tardio com solução hipertônica no pulmão de ratos endotoxêmicos. Ratos Wistar foram separados em 4 grupos (n=10): CTL (sem nenhum insulto ou tratamento); LPS (injetados com LPS 10mg/Kg i.p); HIPER (animais que receberam tratamento com solução hipertônica 7,5% NaCl i.p na dose de 4ml/Kg 15 min. ou 1,5 horas após injeção de LPS) e SALINA ((animais que receberam tratamento com solução salina 0,9% NaCl i.p na dose de 34ml/Kg 15 min. ou 1,5 horas após injeção de LPS). Foram avaliados a mortalidade, e após 24 horas o edema e a mecânica pulmonar, os colágenos tipo I e tipo III, a expressão e atividade da MMP-9, a expressão de FAK e a síntese de óxido nítrico (NO). Nossos resultados mostraram que o tratamento precoce com solução hipertônica evitou a morte dos animais endotoxêmicos. Nenhum dos tratamentos modulou os mediadores inflamatórios. O tratamento precoce com solução hipertônica diminuiu a síntese de iNOS e nitrito, a expressão e atividade de MMP-9 e de FAK, junto com a deposição de colágeno tipo I evitando a substituição do colágeno III. Observamos melhora dos parâmetros de mecânica respiratória. O tratamento tardio com solução hipertônica não apresentou os mesmos resultados promissores observados no tratamento precoce, sugerindo que o tempo de administração da hipertônica é de grande importância para obtenção de seus efeitos terapêuticos.

Descritores: Sepse; Lesão pulmonar aguda; Inflamação; Solução salina hipertônica; Fibrose pulmonar; Síndrome do desconforto respiratório do adulto; Colágeno; Endotoxemia; Lipopolissacarídeos; Ratos.

ABSTRACT

Abstract

Petroni, RC. Role of hypertonic saline solution (NaCl 7,5%) in lung remodeling of endotoxemic rats. [thesis] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Sepsis syndrome is caused by inappropriate immune activation due to bacteria and bacterial components released during infection. The respiratory failure is among the most frequent complication of severe sepsis, occurring in almost 80% of the cases. About 40% of septic patients develop acute respiratory distress syndrome (ARDS) which is characterized mainly by the change of respiratory function, interstitial lung edema and fibronectin and collagen deposition in the lung. Fluid resuscitation is normally used in the management of patients with severe sepsis and septic shock. Hypertonic saline solution (HS, NaCl 7,5%) has shown to modulates immune function and decrease pulmonary injury triggered by endotoxemic shock. Our objective was to investigate the effects of early and later HS treatment on the mechanism involved in pulmonary injury, in an experimental model of endotoxemic shock. Wistar rats received lipopolysaccharide - LPS (10mg/kg i.p.) and volume i.v. after 15 minutes (early) or 1,5 hours (later). The animals were assigned in four groups (n=10): control group (not subjected to LPS); LPS group (injected with LPS 10mg/kg i.p.); HS group (treated with hypertonic saline, 4 mL/Kg i.v. after LPS) and NS group (treated with normal saline, 34 mL/kg i.v. after LPS). We evaluated mortality and at 24h after treatment, pulmonary edema and mechanics, type I and type III collagen expression, metalloproteinase 9 expression and activity, focal adhesion kinase (FAK) and nitric oxide (NO) synthesis were measured. In the early treatment NS increased pulmonary resistance and elastance, compared to other groups. HS inhibited collagen expression compared to LPS and NS groups and prevented pulmonary injury by decreasing MMP-9 activity in tissue. Expression of FAK was decreased in HS groups compared to LPS and NS groups. NO expression was decreased in HS group, compared to LPS and NS groups. The later treatment with HS did not showed improvement of previous parameters increasing mortality and pulmonary injury. We concluded that HS treatment of endotoxemic shock at the earliest possible time point maximizes its efficacy in preventing pulmonary injury probably acting on nitric oxide-induced FAK activation pathway, which could modulate the collagen deposition in pulmonary tissue, and consequently decrease the progression of pulmonary fibrosis. Later treatment with HS decreased beneficial effects of hypertonic saline observed in early infusion, showed the importance of timing in the result of fluid therapy.

Descriptors: Sepsis, Acute lung injury; Inflammation; Saline solution, hypertonic; Pulmonary fibrosis, Respiratory distress syndrome, adult; Collagen; Endotoxemia; Lipopolysaccharides; Rats.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 - Sepses: Clínica e Epidemiologia

Sepses é uma síndrome clínica decorrente de complicações de infecções graves sendo caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica e lesão tecidual difusa. Está associada a uma desregulação da resposta inflamatória normal, com liberação maciça e descontrolada de mediadores inflamatórios, criando uma cadeia de eventos que levam à lesão tecidual (1-3).

A sepses representa um subgrupo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). É definida 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 pCO₂ menor que 32 mmHg e d) contagem de leucócitos no sangue acima 12000/ mm³ ou menor que 4000/mm³ (4-6).

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 (7-9). Quando o choque séptico se instala, com hipotensão arterial sistêmica de difícil controle, este estado pode progredir para falência de múltiplos órgãos e sistemas (7, 9-11). As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são responsáveis pela maioria dos casos da sepses (36% e 35%, respectivamente). A sepses grave e o choque séptico estão associados a taxas de mortalidade de 40 a 60% (12). Dados dos Estados Unidos indicam que

ocorrem aproximadamente 751.000 casos de sepse por ano (9, 13). Sepse, SIRS e choque séptico juntos representam a causa mais importante de morte em UTI de adultos, superando as doenças cardiovasculares (14).

No Brasil, dados do estudo BASES mostraram que a sepse é a principal geradora de custos nos setores público e privado (15). 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 totais com a área de saúde. Estudo publicado em 2006 em unidades de terapia intensiva brasileiras demonstrou que 16,7% dos pacientes internados em UTIs desenvolveram sepse, sepse grave ou choque séptico com uma taxa de mortalidade de 16,7% para pacientes com sepse, 34,4% para pacientes com sepse grave e 65,3% para pacientes com choque séptico (15-17).

A mortalidade não tem se modificado nas últimas duas décadas apesar do desenvolvimento de novos antibióticos e aprimoramento de medidas de tratamento intensivo (7, 9, 10, 18). As estratégias novas para o tratamento da sepse foram focadas em inibidores da endotoxina (anticorpo anti-endotoxina), em inibidores de citocinas (TNF) e em bloqueadores de produção de substâncias vasoativas (óxido nítrico) (19). Apesar do considerável investimento em novos medicamentos, a maioria desses não demonstrou qualquer benefício em diminuir a mortalidade em ensaios clínicos. Os estudos da intervenção hemodinâmica precoce dirigida pela saturação venosa de oxigênio, tem se mostrado como possíveis terapêuticas para redução da mortalidade nesta patologia (20-22).

1.2 - Fisiopatologia da Sepse e da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)

A sepse, resposta sistêmica à infecção, é mediada por citocinas produzidas pelas células inflamatórias, que estimulam receptores específicos das células do sistema imunológico e de órgãos alvo. As citocinas: interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são eventos deflagrados precocemente neste processo (23-26). Estas citocinas estimulam a liberação de outros mediadores da resposta inflamatória tais como produtos derivados do ácido araquidônico (PGE2, TXA2), fator ativador de plaqueta (PAF); peptídeos vasoativos tais como bradicinina, angiotensina, peptídeo intestinal vasoativo; uma variedade de produtos derivados do complemento, assim como outras citocinas (12).

1.3 - Mecanismos Moleculares de Ação do LPS

O lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede de bactérias Gram negativas é uma importante ferramenta no estudo da sepse, sendo normalmente utilizado como modelo de estudo para doenças pulmonares decorrentes de sepse (27-30).

O LPS de várias famílias microbianas gram-negativas é constituído de uma porção de polissacarídeo ligado covalentemente com o lipídeo A (LA). A membrana externa da bactéria apresenta a cadeia O a qual é característica e única para cada sorotipo bacteriano e o LA que representa o princípio endotóxico do LPS (31). Depois da entrada do LPS na corrente sanguínea, pelo menos duas proteínas, LBP e CD14, competem para a ligação com esta macromolécula tóxica. A ligação do LPS a LBP sérica facilita a transferência de LPS para CD14. 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 (23-26).

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 iniciando uma resposta inflamatória aguda (Figura 1) (32).

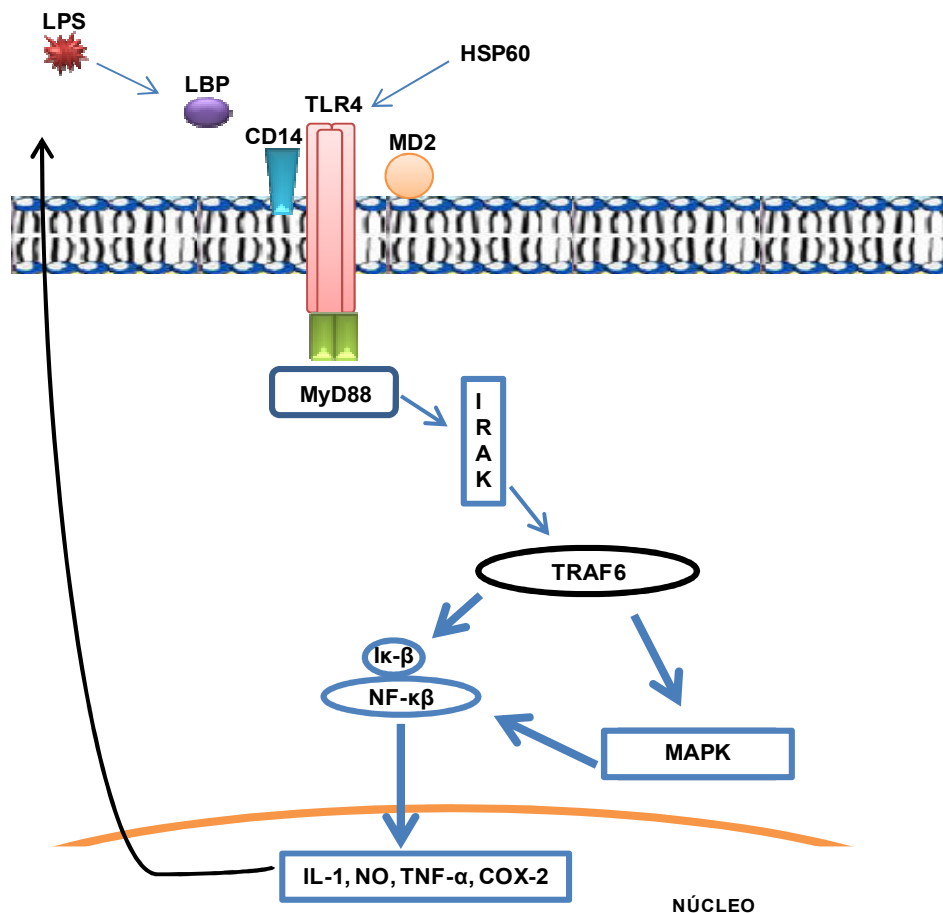


Figura 1. Vias de sinalização celular deflagradas pelo LPS.

1.4 – Mediadores Inflamatórios

O evento central na cascata fisiopatológica da sepse é uma liberação sistêmica excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α , interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-12, IL-18 e interferon- γ em resposta ao LPS (33).

Estas citocinas ativam sistemas celulares (fagócitos e endotélio) e humoral (rotas de coagulação e ativação de complemento, mediadores de baixo peso molecular) os quais são primariamente orientados para eliminação de bactérias invasoras, podendo causar inflamação generalizada autodestrutiva e levar a falência de múltiplos órgãos (34).

As citocinas promovem o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, bem como sua ativação com conseqüente aumento da atividade microbicida, sendo a resposta local fundamental para o controle da infecção. A evolução de uma infecção localizada para um quadro sistêmico caracteriza-se pela presença de citocinas pró-inflamatórias na circulação e ativação das células circulantes, podendo, também, haver a presença de bactérias, endotoxinas ou exotoxinas. Estas citocinas desempenham importantes papéis no desenvolvimento da sepse, interferindo no prognóstico, evolução e intensidade do dano tecidual (35).

O sistema imunológico dispõe de uma ampla gama de células e substâncias para a proteção contra agentes infecciosos. Vários tipos celulares tais como monócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células endoteliais participam da resposta inflamatória exarcebada existente na sepse liberando uma grande variedade de mediadores (36). Os monócitos e macrófagos liberam citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Os linfócitos T podem apresentar duas polarizações: T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). O padrão

Th1 é caracterizado pela secreção de IFN- γ , TNF- α , IL-12 e no padrão Th2 há liberação de IL-4 e IL-10.

O TNF- α é a primeira citocina liberada em resposta a endotoxina, por monócitos e macrófagos. É responsável por aumentar a atividade procoagulante das células epiteliais vasculares, ativação de neutrófilos, além de aumentar a ativação de moléculas de adesão, levando a lesão tecidual (37). A citocina IL-10 apresenta atividade anti-inflamatória. É sintetizada por células Th2 como monócitos e linfócitos B. Sua função é inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos protegendo o hospedeiro da resposta inflamatória sistêmica induzida pelas endotoxinas (37).

Além destes mediadores, proteínas de fase aguda, ativação do sistema de coagulação, sistema complemento e aumento da produção do óxido nítrico estão relacionados aos efeitos deletérios da sepse tanto em pacientes como em modelos experimentais (38).

1.5 - Pulmão e Sepses

O primeiro órgão afetado na sepse intra-abdominal é o pulmão (5). A falência respiratória está entre as mais frequentes complicações da sepse grave, ocorrendo em quase 80% dos casos, porém os mecanismos da falência pulmonar aguda na sepse ainda não estão totalmente esclarecidos (32, 39-41).

Estudos analisando a disfunção orgânica e a morte de pacientes com sepse de origem abdominal observaram que 28% dos pacientes apresentaram insuficiência respiratória, sendo que 63% destes evoluíram para a morte (39).

A lesão pulmonar aguda em pacientes sépticos é caracterizada pelo infiltrado neutrofílico e o aumento da permeabilidade alvéolo capilar ocasionada pela adesão dos neutrófilos nos capilares pulmonares (1).

A sepse causa uma lesão do endotélio vascular pulmonar secundária à inflamação que produz um progressivo edema intersticial, acarretando um desequilíbrio entre a ventilação e a perfusão pulmonar, com hipoxemia refratária, diminuição da complacência pulmonar, deposição de fibronectina e colágeno causando a necessidade de ventilação mecânica para a adequada oxigenação tecidual. Com a progressão do quadro séptico, a saturação venosa, mista, de oxigênio aumenta e a diferença arteriovenosa diminui (27). O gradiente alvéolo-arterial se alarga e há uma diminuição da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (pO_2) (39-42).

A ativação dos neutrófilos, bem como uma liberação excessiva de mediadores citotóxicos na sepse pode causar dano intenso ao tecido pulmonar, contribuindo para uma complicação pós-traumática, como a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e a falência de múltiplos órgãos (43).

1.6 – Fibrose Pulmonar

Pacientes com SDRA induzida pela sepse apresentam diminuição da complacência pulmonar, aumentando assim o trabalho respiratório, com necessidade de ventilação assistida. Isto pode ocorrer por causa do desenvolvimento de fibrose pulmonar, alterando-se assim a complacência pulmonar e conseqüentemente as funções do pulmão (44, 45). Durante a SDRA ocorre proliferação de fibroblastos no interstício pulmonar, além da deposição de colágeno novo no mesmo (46).

A fibrose pulmonar nessa doença é frequentemente definida como intersticial, pois as estruturas entre os espaços aéreos aparecem alargadas por material fibrótico. A fibrose resulta normalmente de colapsos adversos de

fibrose intra-alveolar no qual o edema e os restos celulares do estágio oxidativo da doença são incorporados dentro da parede alveolar (47).

As doenças fibróticas pulmonares são caracterizadas pela expansão da população de células mesênquimais e deposição de colágeno em períodos tardios. Porém, recentemente diversos trabalhos têm mostrado que ao contrário do que se pensava, a deposição de colágeno no tecido pulmonar ocorre precocemente (40, 48, 49). Marshall e colaboradores mostraram em seu estudo que a fibroproliferação ocorreu em estágios precoces da SDRA, sugerindo que os mecanismos que deflagram a deposição de colágeno (proliferação de fibroblastos e a síntese de pró-colágeno) são rapidamente deflagrados nessa doença (27). Estudos mostraram que pacientes com SDRA decorrente de sepse que sobreviveram mais do que duas semanas apresentaram o dobro de colágeno em seus pulmões. Este fato pode ter contribuído com a progressiva perda de função respiratória apresentada por esses pacientes (50, 51). Estas alterações têm sido recentemente demonstradas como consequência da ativação da proteína quinase de adesão focal (do inglês *focal adhesion kinase* – FAK) (52). A FAK é uma proteína do citoesqueleto e/ou membrana celular, que realiza uma ação de transdução de sinal decorrente da inflamação ou tensão no tecido pulmonar. A ativação da FAK leva a ativação celular e conseqüentemente a produção de colágeno, que vão resultar em um dano da arquitetura pulmonar, alterando sua complacência e as trocas gasosas (53, 54). Estudos têm mostrado que a ativação da FAK no tecido pulmonar é responsável pela deposição exarcebada de colágeno no tecido levando a diminuição da função respiratória (55, 56).

A síntese de colágeno no pulmão é um processo dinâmico, necessário para manter a arquitetura do tecido. As fibras colágenas são as principais componentes da matriz extracelular (MEC). Apesar da presença abundante de vários tipos de colágeno nos tecidos conectivos, os colágenos tipo I, II, III (fibrilar) e IV, V e VI (não fibrilar) representam as principais fibras colágenas. O pulmão é caracterizado pela presença principalmente do colágeno tipo I (mais abundante no tecido pulmonar), o colágeno tipo III e o colágeno tipo V (57).

. As mortes causadas pela SDRA ocorrem quando a fibrose desempenha um papel predominante na cicatrização, resultando em uma piora da complacência pulmonar e da oxigenação tecidual. A excessiva síntese de colágeno no pulmão e seu acúmulo em fases avançadas da doença podem contribuir com os altos índices de morte dos pacientes e por promover uma disfunção respiratória progressiva e intensa (27).

1.7 – Metaloproteinases (MMPs)

A fibrose pulmonar é caracterizada pelo acúmulo de proteínas da matriz extracelular, dentre elas, o colágeno. O desbalanço entre a síntese e a degradação das proteínas da matriz extracelular leva ao acúmulo de colágeno no tecido. Neutrófilos ativados presentes durante a SDRA, liberam enzimas como as metaloproteinases responsáveis pela invasão tecidual e pelo controle na deposição das proteínas da matriz extracelular.

As metaloproteinases (MMPs) são endopeptidases dependentes de Ca^{2+} e Zn^{2+} responsáveis pela digestão de vários componentes estruturais da matriz extracelular (MEC), como o colágeno, a elastina, a fibronectina e a lâminina. As MMPs também podem digerir outras proteínas extracelulares. Seus alvos incluem um grande número de receptores de superfície celular, fatores de

crescimento, citocinas e quimiocinas. (58). A proteólise desencadeada pela ação das MMPs desempenha papel importante em diversos processos biológicos como no desenvolvimento embrionário, morfogênese, remodelamento ósseo, homeostase, cicatrização, etc. A expressão e atividade das MMPs são rigorosamente reguladas e controladas pela ação de mecanismos endógenos como os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) (59). Estudos têm mostrado que a alteração no balanço durante essa regulação resulta em grande variedade de doenças como tumores e esclerose múltipla (60, 61).

Em humanos foram identificadas mais de 27 MMPs as quais são agrupadas em collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e MMPs de membrana (60). As MMPs são secretadas por várias células (fibroblastos, células epiteliais, macrófagos) como pró-enzimas latentes (zimogênio), que necessitam ser ativadas no ambiente extracelular pela quebra da união do zinco no seu centro ativo, através de processos físicos, químicos ou proteolíticos. Essa clivagem do pró-peptídeo da enzima secretada pode ser ativada pela ação de enzimas proteolíticas de outras famílias como também pelas próprias MMPs (62). A MMP-9 é particularmente importante na infiltração tecidual pelos polimorfonucleares durante a inflamação uma vez que podem degradar componentes da membrana basal vascular, como colágenos tipos I, II, IV, e V além de fibronectina e gelatina.(63). A potencial atividade destrutiva das metaloproteinases é limitada por IL-10, que não somente inibe a produção de MMP-9, mas também induz a produção de TIMPs. Diversas citocinas como o IFN- γ , IL-4 e TGF- β diminuem a produção de MMPs. Entretanto IL-1 β e TNF- α aumentam a produção e a secreção destas enzimas (64).

1.8 - Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre sintetizado a partir da L-arginina. As enzimas que catalisam esta reação são chamadas de NO sintase (NOS). Há três diferentes isoformas de NOS em células de mamíferos: NOS endotelial (eNOS ou NOS3) encontrada em células endoteliais, epiteliais e miócitos cardíacos; NOS neuronal (nNOS ou NOS1) encontrada em células neuronais e musculatura esquelética; NOS induzível (iNOS ou NOS2) encontradas em macrófagos, hepatócitos e células epiteliais pulmonares (65-68).

A eNOS e a nNOS, são enzimas expressas constitutivamente e sua ativação é dependente do aumento de Ca^{2+} intracelular. A eNOS está envolvida na regulação do tônus vascular enquanto a nNOS desempenha importante papel na neurotransmissão. A iNOS é funcionalmente independente de Ca^{2+} e normalmente não é expressa constitutivamente, sendo sua expressão induzida em determinados eventos fisiopatológicos e na resposta imune (67, 68). A iNOS é expressa por estímulos pró inflamatórios como a endotoxina (LPS) e interferon gama (IFN- γ). O NO produzido pela iNOS desempenha um importante papel no efeito protetor contra bactérias exercido pelos macrófagos (65).

Em condições fisiológicas o NO desempenha um papel de citoproteção através da eliminação de radicais livres como o superóxido, limitando o seu efeito citotóxico sobre o tecido pulmonar (69). Na sepse o NO apresenta um perfil de produto tóxico, promovendo um intenso processo imunoregulatório através da ativação de neutrófilos, macrófagos, monócitos e células endoteliais (67). Em modelos experimentais de endotoxemia, os pulmões expressam níveis extremamente altos de iNOS em macrófagos alveolares, células

epiteliais, endoteliais e intersticiais pulmonares por períodos prolongados. Esses altos níveis de iNOS estão entre os principais responsáveis pela lesão pulmonar decorrentes da endotoxemia (65, 69).

1.9 – Ressuscitação Volêmica

A resposta inflamatória decorrente da sepse leva a um aumento na perda de água e piora da permeabilidade microvascular resultando na diminuição do volume intravascular e levando a necessidade de reposição volêmica a fim de atingir e manter a pressão de perfusão adequada dos tecidos (70, 71).

A reposição volêmica é um importante tratamento do choque endotoxêmico. Estudos têm demonstrado que a reposição volêmica melhora os parâmetros hemodinâmicos, restaura o volume intravascular, além de melhorar a perfusão e diminuir a lesão tecidual decorrente da sepse (72, 73). Embora a reposição volêmica seja normalmente utilizada em pacientes sépticos, não há consenso quanto ao volume a ser administrado. Estudos mostram que pacientes tratados com balanço positivo de fluido apresentam resultados clínicos piores como diminuição da função pulmonar, aumento da pressão intra-abdominal e aumento do risco de mortalidade (74, 75).

A administração de volumes menores de fluídos em pacientes com SDRA é responsável pela melhora do paciente, diminuindo o tempo de utilização de ventilação mecânica sem que ocorra qualquer morbidade associada (74).

1.10 - Solução Hipertônica – NaCl 7,5% (SH)

A solução salina hipertônica (7,5% salina, SH) tem sido apresentada como um potencial agente terapêutico em diversos modelos de lesões (76). O

uso da SH tem demonstrado inibição da lesão pulmonar aguda (LPA) causada pela isquemia-reperfusão, choque hemorrágico e pancreatite aguda em modelos experimentais (43, 76).

Velasco e colaboradores (77) observaram em 1980 que a ressuscitação com solução salina hipertônica de cachorros induzidos ao choque hemorrágico, apresentou grande efetividade na recuperação dos parâmetros hemodinâmicos desses animais. Recentemente outros autores têm demonstrado que a SH apresenta-se como forma alternativa de ressuscitação, possuindo grande potencial imunomodulatório em vítimas com traumas e em pacientes com sepse (39, 78-80). A solução salina hipertônica (SH) demonstrou vantagem por ter efeitos benéficos como fluido restaurador de volume no cenário clínico (81-85). A utilização da SH tem sido relacionada com alterações significantes na imunidade inata, alterando a ativação de neutrófilos, inibindo o “burst” oxidativo, atenuando a resposta citotóxica nos neutrófilos e inibindo a ativação de monócitos/macrófagos *in vitro* (86, 87).

A SH, além de aumentar o volume plasmático, apresenta efeitos anti-inflamatórios significantes (88). A solução hipertônica modula favoravelmente eventos celulares em pacientes com SIRS (89), inibindo a expressão de TNF- α e aumentando a produção de IL-10 por macrófagos alveolares, desempenhando um mecanismo protetor em relação a resposta inflamatória sistêmica (90). Outro importante papel da SH está relacionado à diminuição de infiltrado inflamatório, redução da inflamação pulmonar e diminuição dos níveis de interleucina 6 (IL-6) em tecido pulmonar de animais que receberam reposição volêmica (91, 92). A presença de neutrófilos no tecido pulmonar, o qual desempenha um importante papel no mecanismo da lesão tecidual,

também é atenuada pelo uso da SH em diversos modelos de lesão pulmonar aguda (43, 93, 94).

O acúmulo de neutrófilos no pulmão é pré-requisito necessário para o desenvolvimento de lesão pulmonar (91). A solução salina hipertônica reduz, mas sem abolir, as vias pró-inflamatórias, permitindo um adequado balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, portanto mantendo a habilidade para eliminar as bactérias eficientemente e reduzindo a inflamação disseminada (80). Os dados sobre o potencial imunorregulatório da solução salina hipertônica em reduzir a resposta inflamatória, além dos clássicos efeitos hemodinâmicos apontam para a possibilidade de uma ação terapêutica adequada em pacientes com sepse. A procura por terapêuticas que interfiram na resposta inflamatória e imunológica em processos inflamatórios de alta mortalidade, como a SDRA decorrente da sepse, pode significar avanços importantes no tratamento de pacientes portadores dessas patologias.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 – Objetivo Geral:

O presente trabalho teve por objetivo demonstrar a ação terapêutica do tratamento com solução salina hipertônica precoce e tardiamente sobre os mecanismos fisiopatológicos que produzem as alterações pulmonares na endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo.

2.2 – Objetivos Específicos:

Estudar os efeitos dos tratamentos precoce e tardio com solução hipertônica e solução salina sobre:

- O edema pulmonar de ratos endotoxêmicos.
- O processo inflamatório no tecido pulmonar de ratos endotoxêmicos.
- O remodelamento do tecido pulmonar através da análise da deposição de colágeno e a expressão e atividade da MMP-9.
- A mecânica funcional pulmonar.
- A via de sinalização da proteína quinase de adesão focal (FAK) e sua possível relação com o óxido nítrico sintetizado em pulmões de ratos endotoxêmicos.

MÉTODOS

3. Métodos

3.1- Modelo Biológico

Foram selecionados ratos machos Wistar, pesando entre 200-250 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os ratos foram mantidos em gaiolas por sete dias, em local com temperatura e ciclo de luz controlado, recebendo água e comida *ad libitum*. Os animais permaneceram durante o experimento no Biotério de Manutenção do LIM 17 – Disciplina de Reumatologia, sob responsabilidade do biólogo Antônio dos Santos Filho.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo *The Universities Federation for Animals Welfare* (UFAW). Nosso projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). Protocolo de Pesquisa nº 0428/09.

3.2 - Anestesia

Para o tratamento dos animais com injeção de solução hipertônica ou salina e para o processo de toracotomia e retirada dos pulmões, os animais foram anestesiados com 3% de halotano em uma mistura gasosa de 30% de oxigênio e 70% de óxido nitroso.

3.3 - Tempo de Estudo

Os ensaios foram realizados 24 horas após a injeção intraperitoneal de LPS e no caso dos animais tratados houve grupos que receberam solução hipertônica ou salina 15 minutos (precoce) e grupos que receberam solução hipertônica ou salina 1,5h (tardio) após injeção de LPS.

3.4 - Constituição dos Grupos e Protocolo Experimental

Cada grupo está constituído por 10 animais.

- **Grupo Controle (CTL) 24 horas:**

Os ratos não receberam insulto ou tratamento.

- **Grupo Endotoxêmico (LPS) 24 horas:**

Os ratos foram submetidos à endotoxemia por injeção intraperitoneal (i.p) na dose de 10mg/Kg de *Lipopolysaccharide* (LPS) de *Escherichia coli* (serotype 026:B6/Sigma, MO, USA) (95). Os animais foram sacrificados 24 horas após o tratamento.

- **Grupo Endotoxêmico 24 horas tratado com solução hipertônica (HIPER) após 15 minutos ou 1,5 horas da injeção de LPS:**

Os animais submetidos à endotoxemia por injeção intraperitoneal (i.p) na dose de 10mg/Kg de LPS, receberam solução salina hipertônica (7,5% NaCl) na dose de 4 ml/kg por injeção na veia peniana após 15 minutos (precoce) ou 1,5 horas (tardio) da injeção de LPS, Os animais foram sacrificados 24 horas após o tratamento.

- **Grupo Endotoxêmico 24 horas tratado com solução salina (SALINA) após 15 minutos ou 1,5 horas da injeção de LPS:**

Os animais submetidos à endotoxemia por injeção intraperitoneal (i.p) na dose de 10mg/Kg de LPS, receberam solução salina (0,9% NaCl) na dose de 34 ml/kg por injeção na veia peniana após 15 minutos (precoce) ou 1,5 horas (tardio) da injeção de LPS. Os animais foram sacrificados 24 horas após o tratamento.

3.5 - Curva de Sobrevida

Após injeção de LPS e/ou tratamento com solução salina ou solução hipertônica, os animais foram observados e os óbitos foram registrados a cada 12 horas pelo período total de 72 horas.

3.6 - Determinação de Edema Pulmonar

Os pulmões foram removidos dos animais, armazenados em tubos de 1,5 mL e pesados imediatamente após sua retirada. Os pulmões foram armazenados em estufa por 48h e novamente pesados. O peso do pulmão imediatamente após sua retirada foi dividido pelo seu peso seco (razão), medido após 48h na estufa. O resultado final foi corrigido pelo peso de cada animal a fim de minimizar os possíveis erros decorrentes da variação de peso desses animais.

3.7 - Análise da Função Pulmonar

Os animais de cada grupo foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (50 mg/kg, por via intraperitoneal), traqueostomizados com um cateter intravascular 20G e conectados a um respirador para pequenos animais (flexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá). Um diagrama esquemático do respirador mecânico que foi utilizado é apresentado na Figura 2.

Os animais foram ventilados com volume corrente de 8 mL/kg e frequência respiratória de 90 ciclos/minuto. Utilizamos PEEP de 5 cmH₂O conectado à válvula expiratória do ventilador.

Ptr (pressão traqueal), v (fluxo) e V (volume) foram coletados durante uma oscilação sinusoidal. A resistência (Rrs) e elastância (Ers) do sistema respiratório foram calculadas automaticamente por um computador, através da equação de movimento:

$$P_{tr}(t) = E_{rs} \cdot V(t) + R_{rs} \cdot v(t)$$

Onde:

- $P_{tr}(t)$ é a pressão a abertura aérea
- $V(t)$ é o volume que entra nos pulmões
- $v(t)$ é o fluxo de ar
- (t) é o tempo

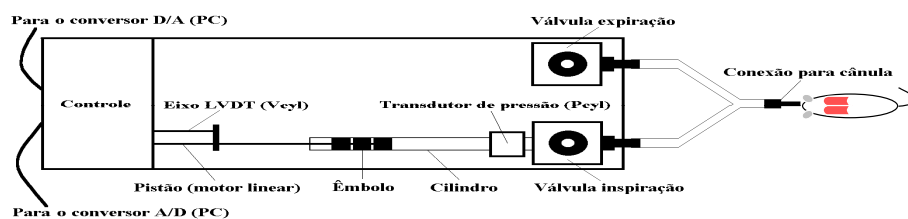


Figura 2. Esquema do respirador para pequenos animais (Flexivent-Scireq), que foi utilizado para a coleta dos dados de mecânica respiratória.

3.8 - Quantificação de Expressão Gênica

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

3.8.1- Extração de RNA

O RNA total dos homogeneizados foi extraído com 1 mL de Trizol (Invitrogen, CA, USA) em tubos de 1,5 mL, seguido de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 200 μL de clorofórmio, os tubos foram agitados em *vortex* e incubados por 3 minutos em

temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5804R) a 4°C durante 15 minutos a 12000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 500 µL de isopropanol gelado. Após incubação por 10 minutos a amostra voltou a ser 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, MO, USA) e armazenado em freezer -80°C.

3.8.2 - Reação de PCR em tempo real

A expressão dos genes foi avaliada por PCR em tempo real utilizando o equipamento StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, NY, USA) com o kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, CA, USA) que contém SYBR[®] Green I como fluoróforo. A quantificação da expressão gênica foi realizada por $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (96, 97), usando o gene da $\beta 2M$ como controle interno. As sequências dos iniciadores específicos utilizados, assim como o tamanho dos fragmentos foram:

$\beta 2M$: sense CGTGATCTTTCTGGTGCTTGTC; antisense TTCTGAATGGCAAGCACGAC, gerando um produto de 604 pares de bases. A reação constou por 40 ciclos e temperatura de *Annealing* de 60°C.

iNOS: sense TGGAGCATCCCAAGTACGAGTG; antisense GCCCATGTACCAACCATTGAAG, gerando um produto de 170 pares de bases. A reação constou por 40 ciclos e temperatura de *Annealing* de 58°C.

MMP-9: sense CAAACCCTGCGTATTTCCAT; antisense AGAGTACTGCTTGCCCAGGA, gerando um produto de 223 pares de bases. A reação constou por 40 ciclos e temperatura de *Annealing* de 60°C.

3.9 - Análise da Atividade da Metaloproteinase-9 (MMP-9) – Zimografia

Amostras dos tecidos coletados foram homogeneizadas em tampão de lise TX-100 (Triton X-100, 10% glicerol, 135mM NaCl, 20mM Tris pH8.0). Em seguida, as amostras de lisado foram centrifugadas a 14000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford. Amostras de 5µg/ml de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra (2% de SDS, 60mM Tris pH6.8, 30% de glicerol e 0.01% de azul de bromofenol) e aplicadas em gel 10% de poliacrilamida contendo 0.2% de gelatina. Após a eletroforese, o gel foi lavado em 10mM de Tris (pH 8.0) contendo 2.5% de Triton X-100, para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida, o gel foi incubado por 15 minutos em solução tampão reveladora (50mM Tris pH8.8, 5mM CaCl₂, 0.02% NaN₃). Posteriormente, o gel foi incubado por 72 horas a 37°C apenas na solução reveladora. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Amersham, NJ, USA) por 2 horas. Em seguida, foi descorado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial em água destilada. As MMPs são identificadas como bandas claras de lise (88 kDa) em fundo azul. A expressão das proteínas foi analisada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público “*Image J*”. As amostras foram normalizadas pelo controle (controle = 1).

3.10 - Quantificação de Citocinas - ELISA

As citocinas TNF- α e IL-10 foram dosadas a partir de homogenato de tecido pulmonar. Aproximadamente 100mg de tecido foram pulverizados em nitrogênio líquido. O material foi homogeneizado em 1 ml de tampão de lise TX-100 (100mM de Tris-HCL pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de Triton X-100, 150mM de NaCl, 0.1% SDS) acrescido de inibidores de proteases (1mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad, CA, USA). As dosagens foram feitas por ELISA, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina de interesse, diluídos em PBS por 12 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS contendo 0.05% de tween 20. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma, MO, USA) por 1 hora. A placa foi lavada para remoção da solução de bloqueio. Em seguida, as amostras e os padrões foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 horas. Ao final do período, as placas foram lavadas. Adicionou-se o anticorpo de detecção, conjugado a peroxidase, e incubou-se por 2 horas. As placas foram, novamente, lavadas. Ao final das lavagens, adicionou-se o substrato da peroxidase, tetrametilbenzidina, deixando agir por 15 a 20 minutos. A reação peroxidase-tetrametilbenzidina gerou cor azul. Ao final da incubação, adicionou-se solução de parada (H₂SO₄ – 2N), obtendo-se coloração amarela. A densidade óptica de cada poço foi detectada através de leitor de placa

SpectraMax™ Microplate Reader (Molecular devices, Minnesota, USA) no comprimento de onda de 450nm. As concentrações das citocinas (pg/mL) foram normalizadas pelas concentrações de proteína total.

3.11 - Análise da Expressão Proteica – Western Blot

Fragmentos de 100mg de tecido foram pulverizados em nitrogênio líquido. O material foi homogeneizado em tampão de lise TX-100 (100mM de Tris-HCL pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de Triton X-100, 150mM de NaCl, 0.1% SDS) acrescido de inibidores de proteases (1mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad, CA, USA). As amostras de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra (2% SDS, 60mM Tris pH 6.8, 5% de mercaptoetanol e 0.01% de azul de bromofenol) e submetidas a eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel 10% de poliacrilamida (1.5M Tris-HCL, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, USA) em aparelho de transferência semi-seca (*Semi-dry Transfer*, Bio-Rad, CA, USA). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio (SuperBlock T20(TBS) Blocking Buffer, Thermo scientific, USA) por 1 hora a temperatura ambiente e em seguida foram lavadas em TBST (50mM de tampão Tris, pH8.0, 100mM NaCl, 1% Tween 20) durante 30 minutos e incubadas com o anticorpo primário contra as proteínas de interesse: Colágeno tipo I (sc8784, diluição 1:1000, Santa Cruz, CA, USA); Colágeno tipo III (sc28888, diluição 1:1000, Santa Cruz, CA, USA); FAK (ab40794, diluição 1:1000, Abcam Inc, MA, USA), pFAK (ab4803, diluição 1:1000, Abcam Inc, MA,

USA), Beta Actina (ab16039, diluição 1:1000, Abcam Inc, MA, USA). Todos os anticorpos foram incubados “*overnight*” a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente com TBST e incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP goat anti-*rabbit* policlonal-sc2004 ou HRP *rabbit* anti-mouse, sc358923, diluição 1:20000, Santa Cruz, CA, USA) a temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente, as membranas foram lavadas com TBST e expostas ao sistema de detecção utilizando o reagente quimioluminescente Super Signal (Pierce Rockford, IL, USA) e analisados em gel documentador (GBOX, Syngene, USA). A expressão da proteína de interesse foi comparada por densitometria de gel, utilizando-se o programa “*GeneTools*” (Syngene, USA), normalizadas pelo controle (controle=1).

3.12 - Quantificação de Nitrito – Reação de Griess

O método de detecção foi baseado na reação do nitrito com reagente de Griess produzindo uma reação colorimétrica detectada por absorvância com leitura em comprimento de onda de 595nm. O nitrato presente na amostra foi reduzido a nitrito utilizando-se as enzimas nitrato redutase e NADPH. A concentração de nitrito foi dividida pela quantidade de proteína presente nas amostras. Para a reação de Griess foram adicionados 100µl da solução de trabalho (solução A: 1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%; e solução B: 0,1% de naftiletilenodiamina em água destilada; misturar partes iguais das soluções A e B). Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente foi realizada a leitura em comprimento de onda de 595nm no leitor de placa SpectraMax™ Microplate Reader (Molecular devices, Minnesota, USA).

3.13 - Cultura de fibroblastos

Sob condições estéreis, fibroblastos NIH-3T3 foram descongelados em banho-maria a 37°C e transferidos para um tubo cônico de 15 mL. Adicionou-se 10 mL de meio de cultura DMEM e centrifugou-se a 1.000 rpm durante 5 minutos para retirada do DMSO do meio de congelamento. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de solução de antibiótico e antimicótico (penicilina 10.000 U, estreptomicina 10.000 µg e 25 µg de anfotericina B) (GIBCO – Invitrogen, NY, USA). Em seguida as células foram plaqueadas em garrafas de cultura utilizando o mesmo meio. As garrafas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de tensão de CO₂.

Após atingir 80% de confluência, a monocamada foi ressuspensa em solução de tripsina a 0,25% (GIBCO – Invitrogen, NY, USA), incubadas a 37°C durante 5 minutos, seguidas pela paralisação da reação pela adição de DMEM completo. O volume da garrafa de cultura foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 1.000 rpm durante 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* com o meio de cultura DMEM e plaqueou-se novamente, representando a segunda passagem. Para realização dos experimentos, foram plaqueadas 1x10⁶ células/mL em placas de 6 poços com 1 mL de meio DMEM.

3.13.1 - Estímulo dos fibroblastos com LPS e solução hipertônica

As células foram ressuspensas numa concentração de 1x10⁶/mL e distribuídas em placas de cultura de células com 6 poços. As células foram separadas em 4 grupos:

• Grupo Controle:

As células foram mantidas em meio de cultura DMEM sem adição de nenhuma outra substância.

• Grupo LPS:

Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura DMEM foi trocado por DMEM contendo LPS de *Escherichia coli* (026:B6 Sigma, MO, USA) na concentração de 1µg/mL.

• Grupo LPS + HIPER:

Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura DMEM foi trocado por DMEM contendo LPS de *Escherichia coli* (026:B6 Sigma, MO, USA) na concentração de 1µg/mL. Quatro horas após exposição das células ao LPS, o meio foi trocado novamente por DMEM contendo solução hipertônica com osmolaridade de 450 mOsm.

• Grupo HIPER:

Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura DMEM foi trocado por DMEM contendo solução hipertônica com osmolaridade de 450 mOsm. Esse grupo não foi estimulado previamente com LPS.

Após 24 horas de exposição, os extratos celulares de todos os grupos foram coletados e armazenados em freezer -80°C para posterior extração de proteínas e quantificação de FAK e pFAK.

3.14 - Análise estatística

Os dados são apresentados como média±erro padrão da média. Para análise estatística de comparação de médias, foi utilizada análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey, sendo considerados como diferença

significativa os grupos que obtiverem $p < 0,05$. O programa *GraphPad Prisma* – Versão 5 (*GraphPad Software Incorporation*) foi utilizado para análise dos dados. Para análise da curva de sobrevida foi utilizado o teste de Log rank.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 - Resultados dos animais tratados após 15 minutos da injeção de LPS

4.1.1 - Curva de Mortalidade

Os dados obtidos demonstram maior mortalidade dos animais injetados com LPS e dos animais tratados com solução salina normal após 15 minutos. Após 48 horas observamos uma mortalidade de 20% dos animais do grupo LPS e 30% dos animais do grupo injetados com LPS e tratados com solução salina normal. Não houve morte de animais do grupo tratado com solução hipertônica no período de análise da mortalidade dos animais (figura 3).

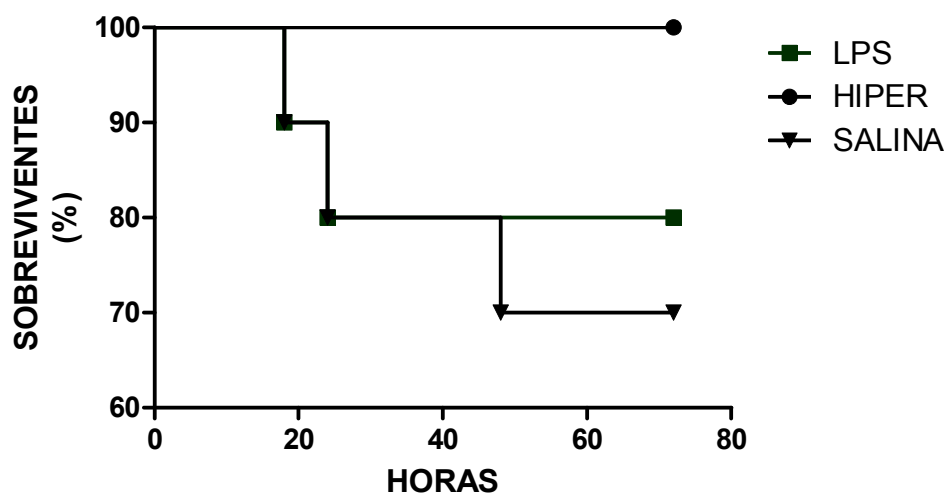


Figura 3. Sobrevida de ratos Wistar separados nos grupos LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) A sobrevivência foi avaliada a cada 12 horas por 72 horas. Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência e os dados apresentados são de 10 animais por grupo.

4.1.2 - Edema Pulmonar

O edema pulmonar foi avaliado pela determinação da porcentagem de água no órgão. A figura 4 mostra que houve aumento significativo na porcentagem da água no tecido dos grupos LPS e Salina quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Os animais tratados com solução hipertônica não apresentaram aumento significativo de edema.

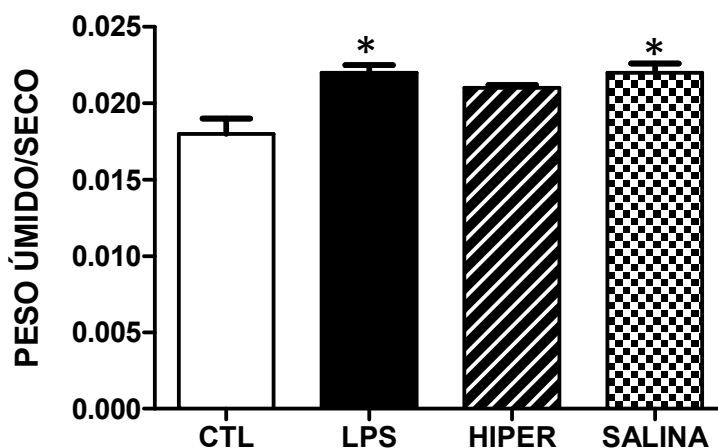


Figura 4. Porcentagem de água presente no tecido pulmonar (relação entre o peso úmido e o seco) de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) sacrificados 24 horas após tratamento. Valores expressos em média±EPM e n=10 animais. * $p < 0,05$ vs. CTL.

4.1.3 - Produção de Mediadores Inflamatórios

Durante a endotoxemia ocorre a ativação de células do sistema imunológico e consequente liberação de mediadores inflamatórios resultando em uma inflamação sistêmica. Assim, avaliamos se o tratamento com solução

hipertônica ou solução salina seria capaz de inibir a liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α e a citocina anti-inflamatória IL-10 no pulmão de animais endotoxêmicos.

Não observamos diferenças significativas entre os grupos com relação à produção de TNF- α e IL-10 em 24 horas.

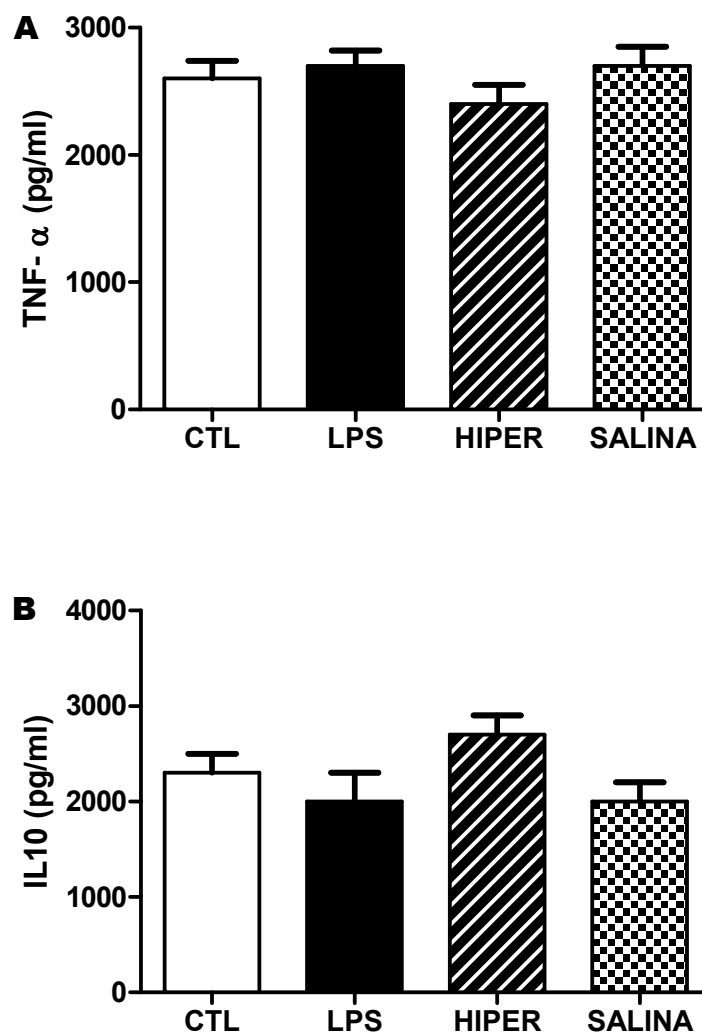


Figura 5. Concentrações de TNF- α (A) e IL-10 (B) determinadas através de ELISA no tecido pulmonar de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 15

minutos após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e avaliados após 24 horas. Valores expressos em média±EPM e n=10 animais.

4.1.4 - Expressão Gênica de Metaloproteinase 9 (MMP-9)

As metaloproteinases são responsáveis pela degradação da matriz extracelular. A expressão de MMP-9 está associada com a destruição tecidual em diversas doenças, dentre elas a lesão aguda pulmonar.

Nossos resultados mostram que a expressão gênica da MMP-9 aumentou significativamente nos animais endotoxêmicos após 24 horas da indução da doença ($p<0,05$). Observamos também, o aumento da expressão de MMP-9 nos animais tratados com solução salina, mantendo o mesmo padrão observado nos animais sem nenhum tratamento, ambos sendo diferente significativamente do grupo controle ($p<0,05$).

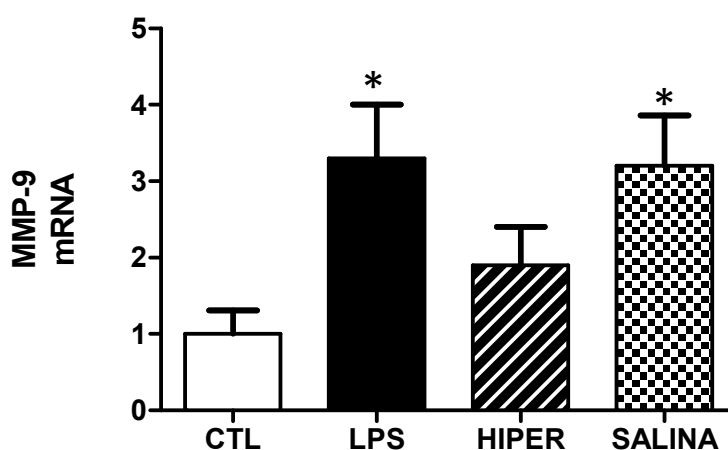


Figura 6. Expressão gênica no pulmão de MMP-9 determinado através de PCR em tempo real de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 15 minutos após LPS)

e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e avaliados após 24 horas. Valores expressos em média±EPM e n=10 animais. * $p<0,05$ vs Controle.

4.1.5 - Atividade da Metaloproteinase 9 (MMP 9)

Observamos que os animais que receberam, injeção de LPS apresentaram tendência a um aumento na atividade da MMP-9, porém quando esses animais receberam tratamento com solução salina ocorreu um aumento significativo na atividade da MMP-9 em relação a todos os outros grupos ($p<0.05$).

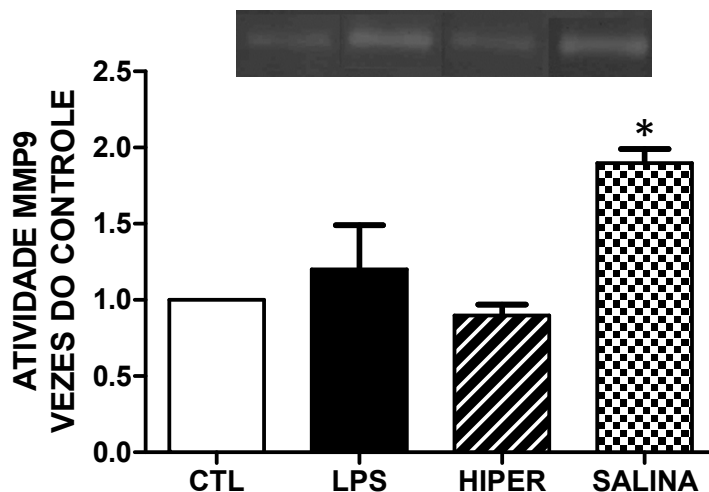


Figura 7. Atividade da MMP-9 determinadas através de zimografia de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e avaliados após 24 horas. Valores expressos em vezes do controle (controle=1) e n=3 animais. * $p<0,05$ vs outros grupos.

4.1.6 - Expressão Proteica de Colágeno Tipo I e Tipo III

O aumento na deposição de colágeno do tipo I está relacionado com uma maior resistência do tecido pulmonar. O colágeno do tipo III apresenta característica de fibras elásticas, estando presente em grande quantidade nos pulmões. Assim, medimos a expressão proteica do colágeno tipo I e tipo III a fim de observarmos se o tratamento com solução hipertônica evitou o desbalanço na deposição destes colágenos no pulmão dos animais endotoxêmicos.

Observamos que os animais induzidos a endotoxemia apresentaram um aumento significativo na quantidade de colágeno tipo I no pulmão quando comparados aos animais CTL e aos animais que receberam reposição volêmica ($p < 0,05$). Os animais do grupo salina apresentaram aumento na deposição de colágeno quando comparados aos animais tratados com solução hipertônica e os animais CTL ($p < 0,05$).

Com relação à deposição de colágeno tipo III, o qual confere elasticidade ao tecido pulmonar, observamos que o tratamento com solução hipertônica mostrou uma tendência em evitar a diminuição deste colágeno no tecido pulmonar; diferente do que ocorreu com os animais sem tratamento ou tratados com solução salina. Porém não houve diferença significativa entre os grupos.

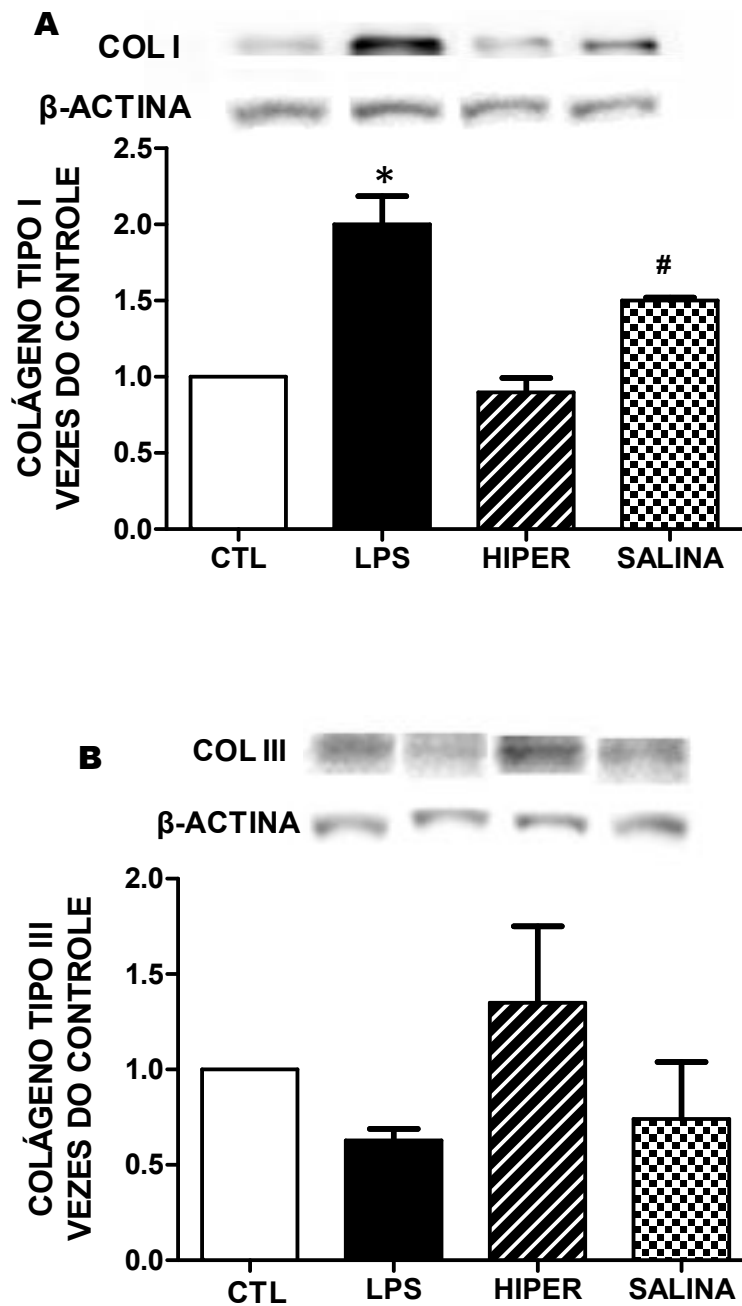
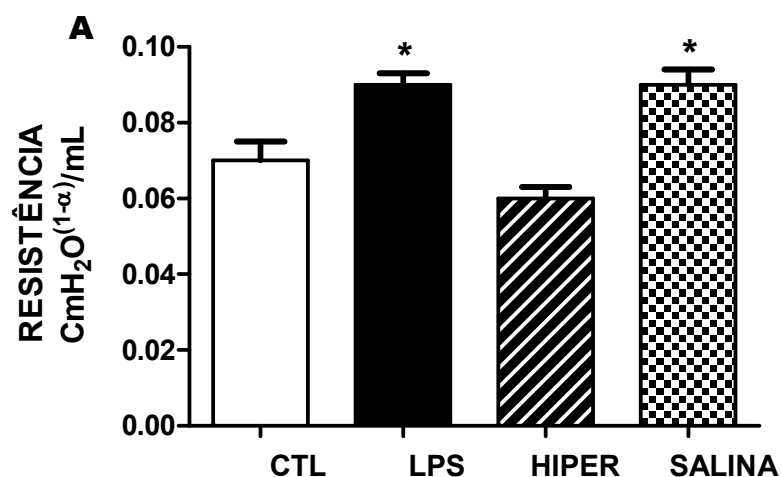


Figura 8. Expressão proteica no pulmão de colágenos tipo I (A) e Tipo III (B) determinada através de Western Blot de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) avaliados após 24 horas. Valores expressos em vezes do controle (controle=1) e n=3 animais. * $p < 0,05$ vs. outros grupos; # $p < 0,05$ vs. CTL e Hiper.

4.1.7 - Função Pulmonar

A partir dos resultados onde observamos que o tratamento com solução hipertônica foi capaz de evitar o desbalanço entre a deposição dos colágenos tipo I e tipo III no tecido pulmonar dos ratos endotoxêmicos, avaliamos a mecânica respiratória desses animais a fim de observar se este fato proporcionaria uma melhora da função respiratória desses animais. Os gráficos mostram que os animais do grupo LPS e os animais tratados com solução salina, diferente dos animais tratados com hipertônica, apresentaram aumento da resistência pulmonar ($p < 0,05$) (Figura 9A).

Com relação à elastância, observamos aumento significativo nos animais tratados com solução salina quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 9B).



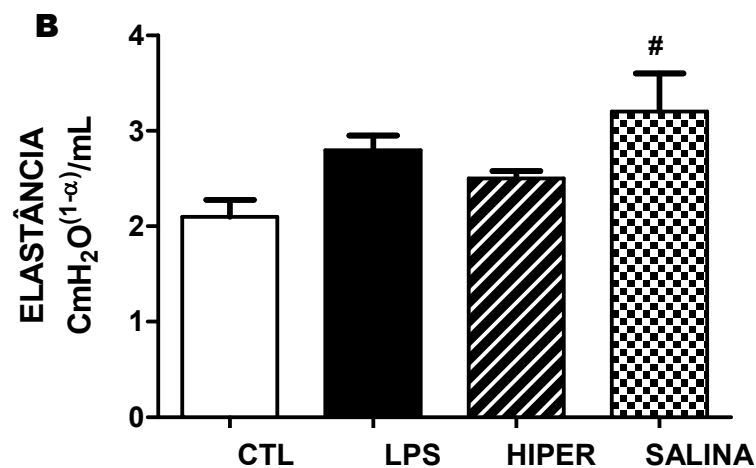


Figura 9. Avaliação da resistência (A) e da elastância (B) do tecido pulmonar de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 15 minutos após LPS), avaliados 24 horas após o tratamento. Valores expressos em média±EPM e n=10 animais. * $p<0,05$ vs. Controle e HIPER, # $p<0,05$ vs. Controle.

4.1.8 - Ativação da FAK

A ativação da quinase de adesão focal (FAK) vem sendo relacionada com o início do mecanismo de remodelamento em diversos modelos de lesão pulmonar. A fim de observarmos se o tratamento de animais endotoxêmicos com solução salina ou hipertônica é capaz de modular essa via, medimos a expressão da FAK no tecido pulmonar desses animais.

Observamos que a atividade da FAK aumentou significativamente nos animais injetados com LPS e nos animais que receberam tratamento com solução salina, quando comparados com os grupos CTL e tratados com solução hipertônica ($p<0,05$) 24 horas após o tratamento (figura 10).

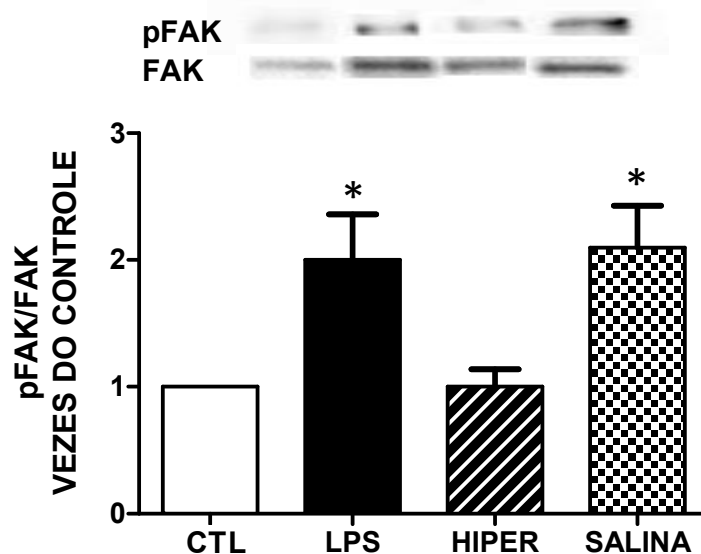


Figura 10. Ativação no pulmão de FAK determinada através de Western Blot de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e avaliados após 24 horas. Valores expressos em vezes do controle (controle=1) e n=3 animais. * $p < 0,05$ vs CTL e Hiper.

4.1.9 - Ação da solução hipertônica na via da FAK

A partir dos resultados apresentados anteriormente, observamos que o tratamento com solução hipertônica preveniu a deposição de colágeno no pulmão, podendo esse processo estar relacionado com a inibição da quinase de adesão focal (FAK). Assim decidimos explorar as vias envolvidas nesse processo a fim de elucidar o mecanismo de ação da solução hipertônica no remodelamento pulmonar dos ratos endotoxêmicos.

Nossa primeira hipótese foi de que o aumento na osmolaridade promovida pela injeção de solução hipertônica estaria alterando o citoesqueleto

das células levando a inibição da FAK e, conseqüentemente, a uma diminuição na produção de colágeno.

Observamos que as células tratadas com LPS e as mantidas em meio de cultura com solução hipertônica apresentaram aumento na expressão da FAK quando comparadas ao grupo CTL ($p < 0,05$) (figura 11). Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação da solução hipertônica através da inibição da FAK não ocorre em resposta às alterações do citoesqueleto em consequência do aumento da osmolaridade.

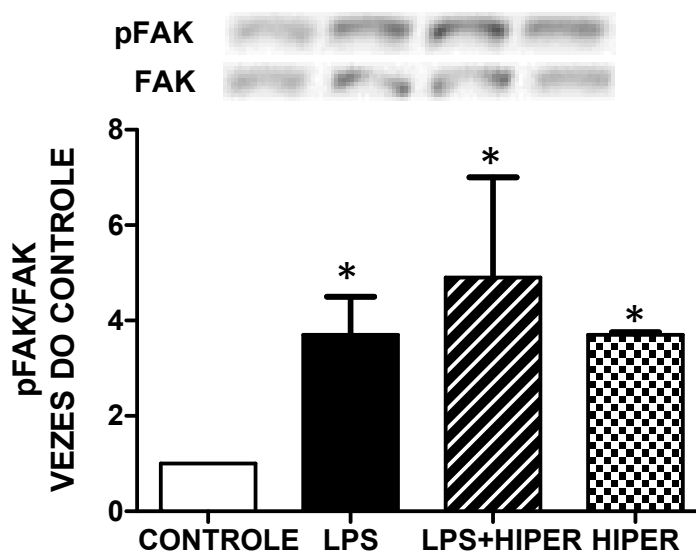
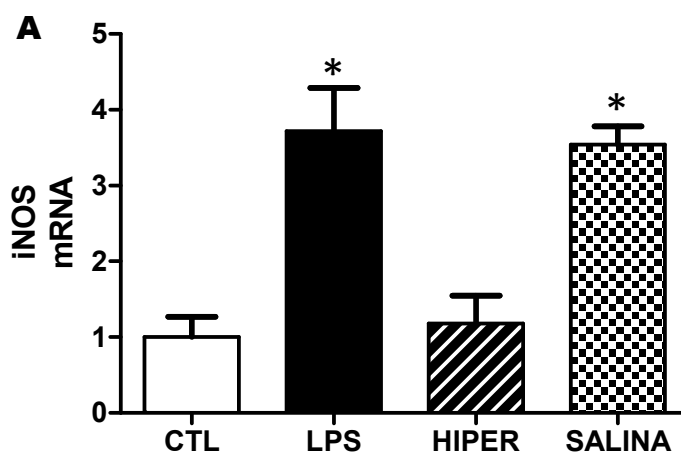


Figura 11. Atividade de FAK em cultura celular de fibroblastos separados nos grupos controle (mantidos em meio de cultura DMEM), LPS (estimulados com LPS 10 μ g/mL), LPS + Hiper (4 horas após estímulo com LPS, o meio foi trocado por meio hipertônico 450 mOsm), Hiper (células mantidas em meio hipertônico 450 mOsm). 24 horas após exposição, as células foram coletadas e as proteínas extraídas para realização de Western Blot. Valores expressos em vezes do controle (controle=1) de 2 experimentos independentes n=3 por experimento. * $p < 0,05$ vs. Controle.

4.1.10 - Ação da solução hipertônica na síntese de óxido nítrico

Alguns autores têm demonstrado que a expressão de óxido nítrico no pulmão está relacionada com a deposição de colágeno no tecido e que este mecanismo envolve a ativação da FAK. A fim de observarmos se o tratamento com solução hipertônica diminuiria a produção de NO levando a inativação da FAK e conseqüente diminuição da deposição de colágeno, foi medido a expressão de iNOS no tecido pulmonar e a quantidade de nitrito, um subproduto do NO, no plasma dos animais.

Os gráficos mostram que a expressão de iNOS no tecido dos animais endotoxêmicos que não receberam tratamento e dos animais tratados com solução salina apresentou-se aumentada quando comparados com o grupo CTL e HIPER ($p < 0,05$) (Figura 12A). Com relação ao nitrito, houve aumento em sua produção nos grupos LPS e Salina quando comparados com o grupo CTL ($p < 0,05$) (Figura 12B).



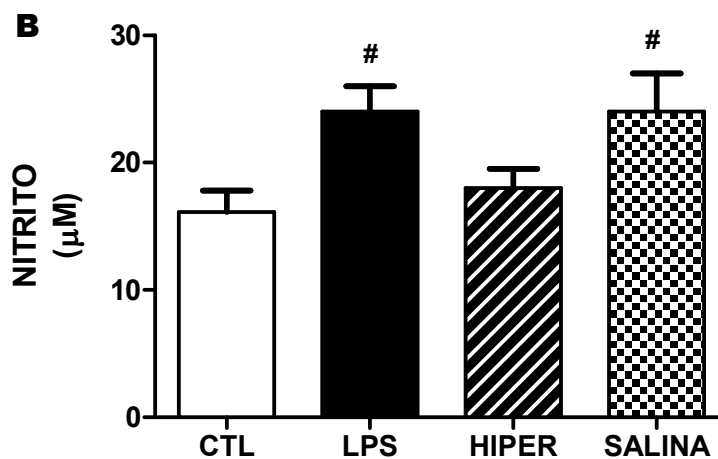


Figura 12. Expressão gênica no pulmão de iNOS (A) determinada através de PCR em tempo real e quantificação de nitrito pelo método de Griess no plasma (B) de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 15 minutos após LPS) e avaliados 24 horas após o tratamento. Valores expressos em média±EPM e n=10 animais.* $p < 0,05$ vs CTL e Hiper; # $p < 0,05$ vs. CTL.

4.2 – Resultados dos animais tratados após 1,5 horas da injeção de LPS

Com o objetivo de aproximarmos nossos resultados da prática clínica, avaliamos qual seria o efeito do tratamento tardio (1,5 horas após indução da endotoxemia) com solução hipertônica e solução salina no pulmão dos animais expostos ao LPS, 24 horas após o tratamento.

4.2.1 - Curva de Mortalidade

A fim de observarmos se o tratamento tardio (após 1,5 horas da indução da endotoxemia) continuaria sendo efetivo, realizamos a curva de mortalidade dos animais endotoxêmicos e tratados tardiamente.

Os dados mostram que diferente do que observamos no tratamento precoce da endotoxemia, os animais tratados com solução salina e com solução hipertônica apresentaram mortalidade próxima dos animais que não foram tratados.

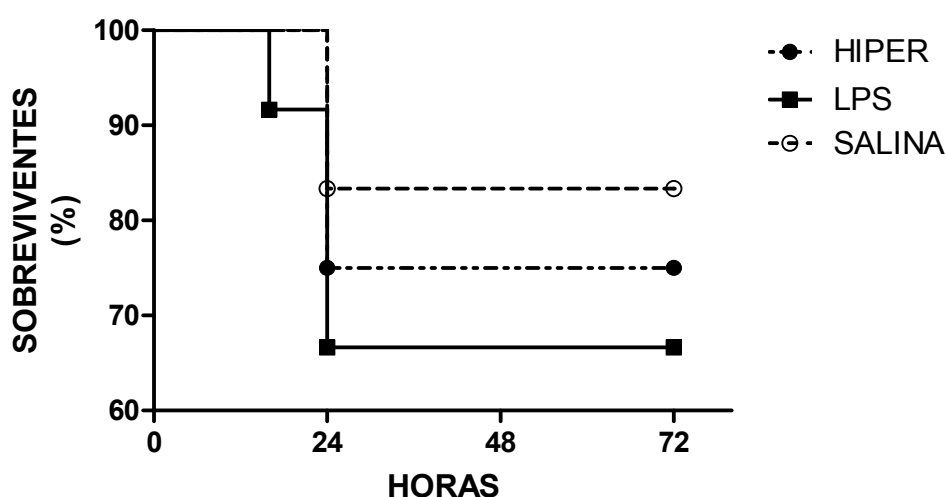


Figura 13. Sobrevida de ratos Wistar separados nos grupos LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) A sobrevivência foi avaliada a cada 12 horas por 72 horas. Os resultados são expressos em porcentagem de sobrevivência e os dados apresentados são de 12 animais por grupo.

4.2.2 - Edema Pulmonar

Observamos que os animais tratados após 1,5 horas da injeção de LPS e sacrificados após 24 horas do tratamento apresentaram tendência em diminuir a porcentagem de água. Essa melhora, porém, não se mostrou significativa.

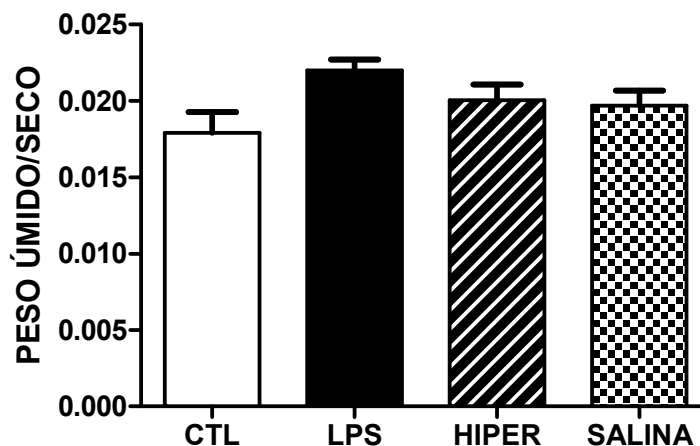


Figura 14. Porcentagem de água presente no tecido pulmonar (relação entre o peso úmido e o seco) de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) sacrificados 24 horas após o tratamento. Valores expressos em média±EPM e n=10 animais.

4.2.3 - Produção de Mediadores Inflamatórios

A fim de observarmos se o tratamento tardio seria capaz de alterar a produção das citocinas pró-inflamatória TNF- α e a antiinflamatória IL-10, medimos suas expressões no tecido pulmonar dos animais endotoxêmicos e tratados.

Nossos resultados mostram que ambos os tratamentos foram responsáveis pela piora nos parâmetros inflamatórios do tecido pulmonar, aumentando a quantidade de TNF- α quando comparados aos animais CTL e LPS ($p<0,05$), e diminuindo a IL-10 quando comparados aos mesmos grupos ($p<0,05$).

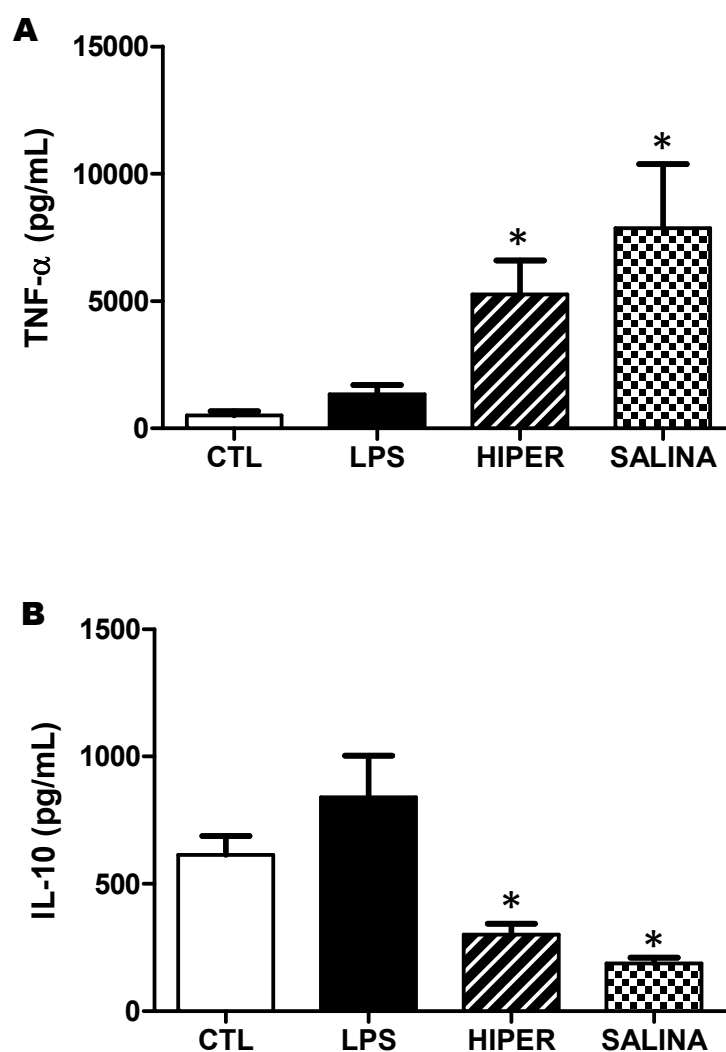


Figura 15. Concentrações de TNF- α (A) e IL-10 (B) determinadas através de ELISA no tecido pulmonar de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e avaliados após 24 horas. Valores expressos em média \pm EPM e n=10 animais. * p <0,05 vs. CTL e LPS.

4.2.4 - Expressão Gênica de Metaloproteinase 9 (MMP-9)

Com a finalidade de observarmos a ação do tratamento tardio com solução salina e solução hipertônica no remodelamento tecidual, medimos a expressão gênica da MMP-9 no tecido pulmonar.

Nossos resultados mostram que a expressão gênica da MMP-9 aumentou significativamente nos animais tratados com solução salina e solução hipertônica 1,5 horas após a indução da endotoxemia quando comparado aos grupos CTL e LPS ($p < 0,05$).

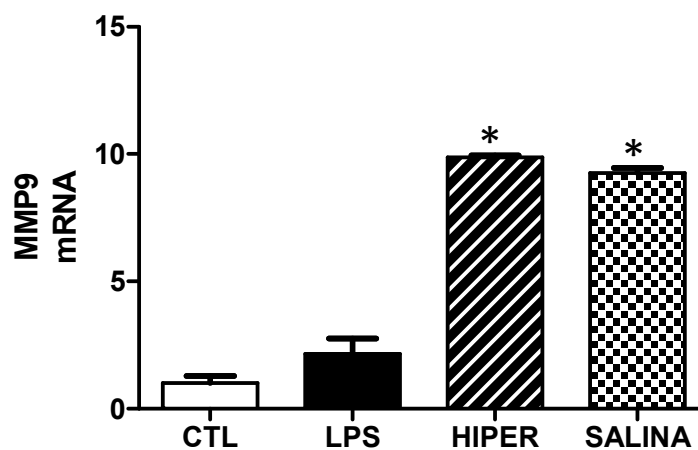


Figura 16. Expressão gênica no pulmão de MMP-9 determinada através de PCR em tempo real de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e avaliados 24 horas após o tratamento. Valores expressos em média±EPM e n=10 animais. * $p < 0,05$ vs CTL e LPS.

4.2.5 - Atividade da Metaloproteinase 9 (MMP 9)

Seguindo o perfil observado na expressão gênica da MMP-9, observamos que a atividade da MMP-9 aumentou nos animais tratados com solução salina e solução hipertônica 1,5 horas após a indução da endotoxemia, porém essa diferença não se mostrou significativa em relação aos outros grupos.

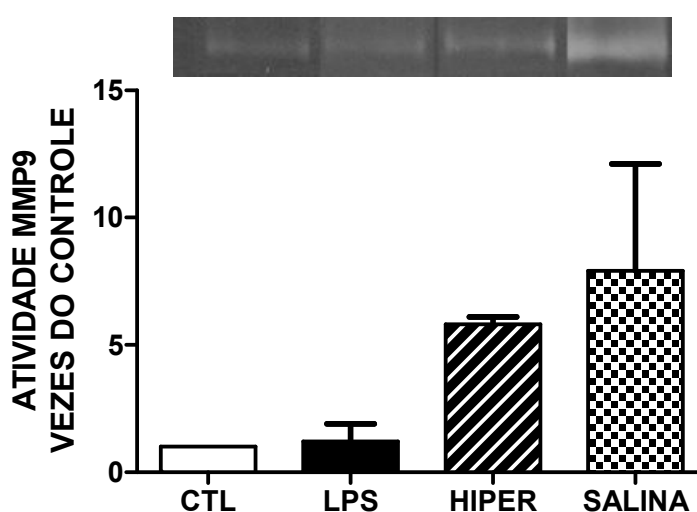


Figura 17. Atividade da MMP-9 determinada através de zimografia de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e avaliados após 24 horas. Valores expressos em vezes do controle (controle=1) e n=3 animais.

4.2.6 - Expressão Proteica de Colágeno Tipo I e Tipo III

Nossos resultados anteriores mostraram que o tratamento com solução hipertônica em períodos precoces foi capaz de diminuir a expressão proteica do colágeno tipo I e evitar a diminuição do colágeno tipo III 24 horas após o tratamento. Assim, avaliamos se o tratamento com solução hipertônica também

seria eficaz no balanço da deposição do colágeno tipo I e tipo III no tecido pulmonar dos animais tratados 1,5 horas após a indução da endotoxemia.

Nossos resultados mostraram que ao contrário do observado nos animais tratados em períodos precoces da doença, a deposição de colágeno do tipo I não se mostrou diminuída em relação aos animais que não foram tratados. O tratamento com solução hipertônica também não foi capaz de evitar a diminuição do colágeno tipo III no tecido pulmonar.

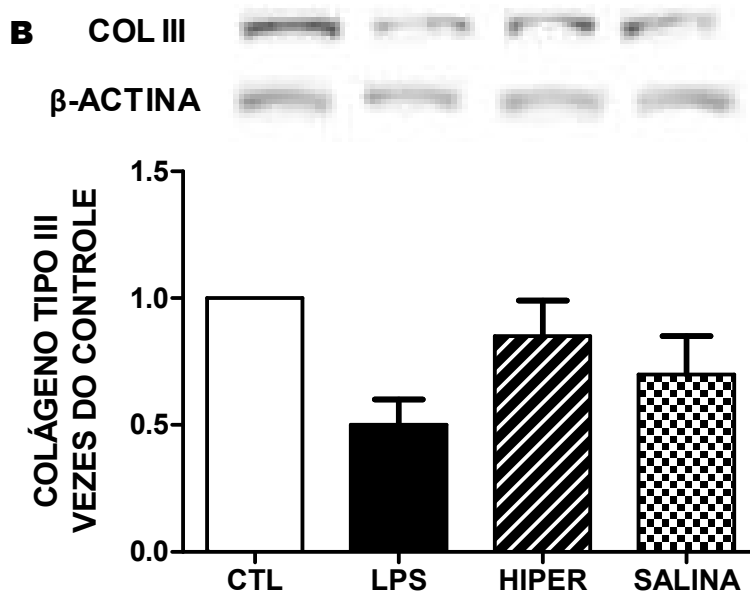
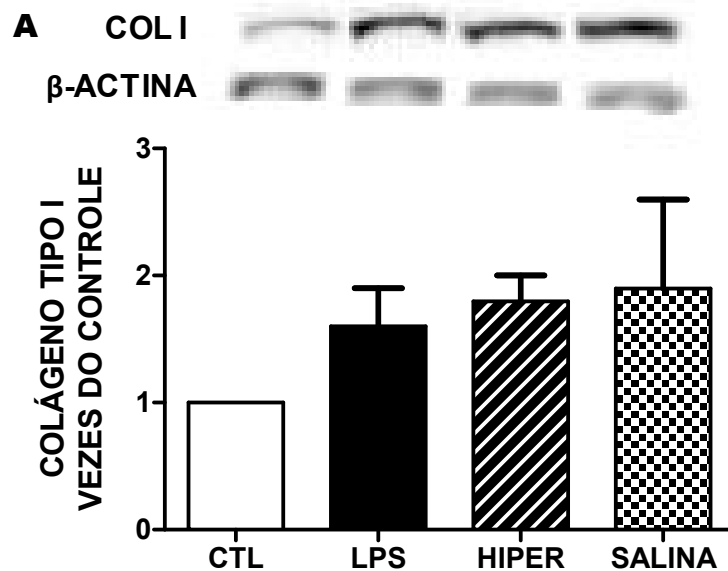
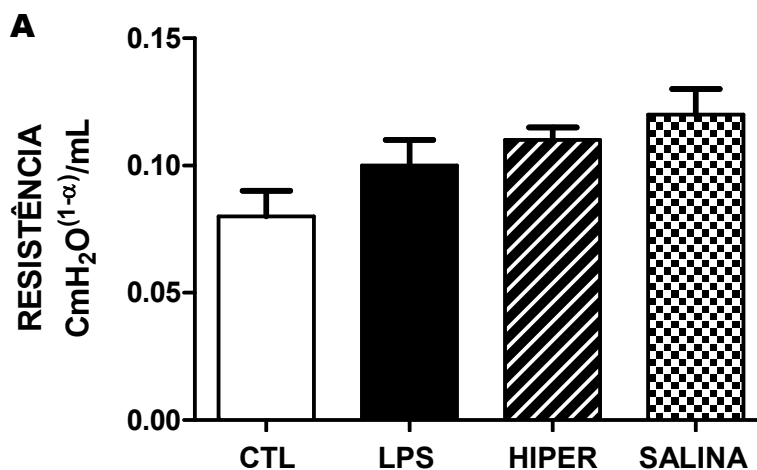


Figura 18. Expressão proteica no pulmão de colágeno tipo I (A) e colágeno tipo III (B) determinada através de Western Blot de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS). Avaliados 24 horas após o tratamento. Valores expressos em vezes do controle (controle=1) e n=3 animais.

4.2.7 - Função Pulmonar

A fim de observarmos se o tratamento tardio dos animais endotoxêmicos com solução salina ou solução hipertônica leva a melhora da mecânica pulmonar 24 horas após o tratamento, medimos a resistência e a elastância do tecido.

Os gráficos mostram que ambos os tratamentos, apesar de mostrar tendência no aumento da resistência e elastância, não alteraram os parâmetros de mecânica pulmonar significativamente.



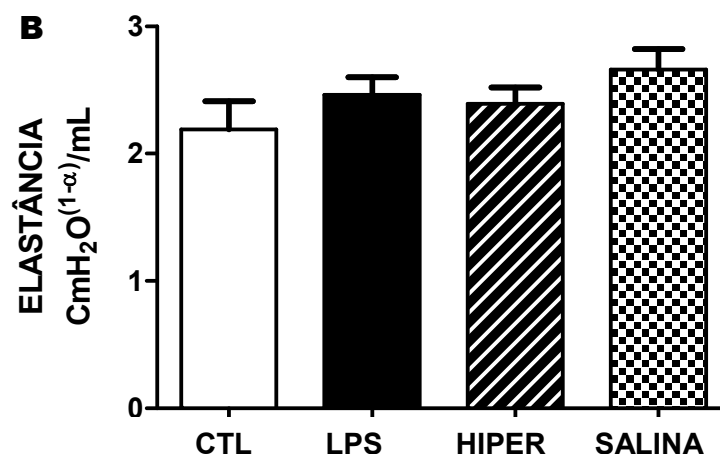


Figura 19. Avaliação da função pulmonar (resistência (A) e elastância (B) do tecido) de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e avaliados 24 horas após o tratamento. Valores expressos em média±EPM e n=10 animais.

4.2.8 - Ativação da FAK

Como mostramos anteriormente, a deposição de colágeno no tecido pulmonar está relacionada com a ativação da FAK. Nossos resultados mostraram que o tratamento tardio com solução hipertônica não evitou o remodelamento tecidual através da deposição de colágeno, sendo assim avaliamos a atividade da FAK a fim de observarmos se sua ativação estaria relacionada com a deposição de colágeno.

Observamos que a atividade da FAK mostrou-se aumentada no tecido pulmonar dos animais tratados com solução salina e solução hipertônica acompanhando os resultados observados com relação à deposição de colágeno.

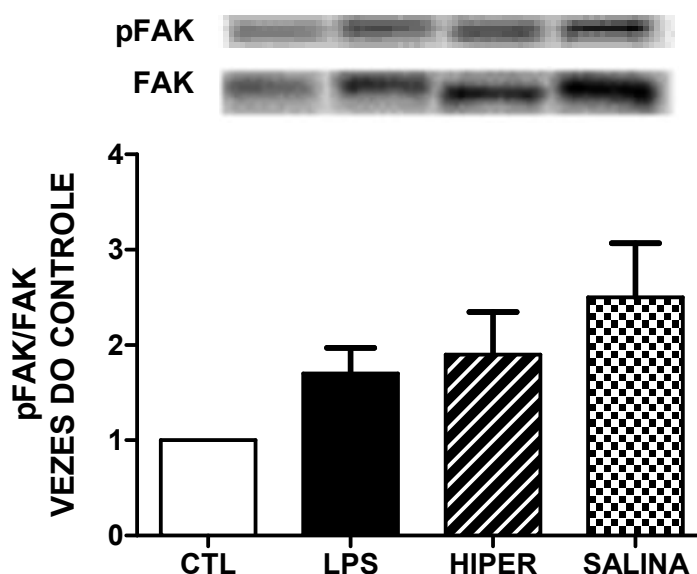


Figura 20. Ativação no pulmão de FAK determinada através de Western Blot de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e avaliados após 24. Valores expressos em vezes do controle (controle=1) e n=3 animais.

4.2.9 - Ação do tratamento tardio com solução hipertônica na síntese de óxido nítrico

O tratamento precoce de ratos endotoxêmicos com solução hipertônica mostrou uma diminuição na expressão de iNOS e nitrito 24 horas após o tratamento. Assim, avaliamos se o tratamento tardio com solução hipertônica ou salina também modularam esses mediadores

Observamos que ambos os tratamentos com solução salina e solução hipertônica, aumentaram a expressão de iNOS quando comparados com os grupos CTL e LPS ($p < 0,05$) (figura 21A). O grupo tratado com solução hipertônica mostrou ainda, aumento significativamente superior ao dos animais

tratados com solução salina na expressão de iNOS ($p < 0,05$). Quanto ao nitrito (figura 21B), observamos que os tratamentos não diminuíram sua produção no plasma dos animais endotoxêmicos.

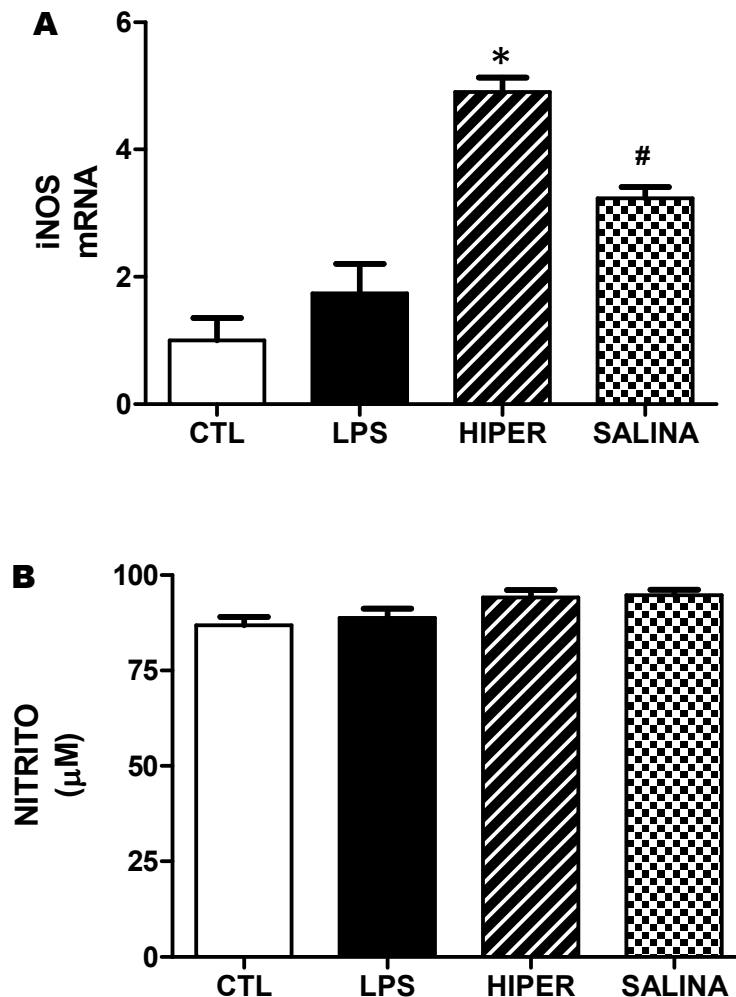


Figura 21. Expressão gênica de iNOS no pulmão (A) determinada através de PCR em tempo real e quantificação de nitrito pelo método de Griess no plasma (B) de ratos Wistar CTL (sem nenhum insulto ou tratamento), LPS (injeção de LPS 10mg/kg i.p), Hiper (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução hipertônica NaCl 7,5% 4ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e Salina (animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. tratados com solução salina NaCl 0,9% 34ml/kg i.v. 1,5 horas após LPS) e avaliados 24 horas após o tratamento. Valores expressos em média \pm EPM e $n=10$ animais. * $p < 0,05$ vs outros grupos; # $p < 0,05$ vs. CTL.

DISCUSSÃO

5. Discussão

A sepse é uma doença grave caracterizada por resposta inflamatória sistêmica, sendo uma das maiores causas de morte em UTI não coronariana (98).

Apesar dos grandes avanços no entendimento da patogênese da sepse, a taxa de mortalidade em pacientes que apresentam a doença continua elevada. O pulmão está entre os primeiros órgãos a serem afetados durante a falência de múltiplos órgãos causada pelo agravamento da sepse. Neste contexto, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) está entre as primeiras causas de mortes em pacientes sépticos internados em unidades de terapia intensiva (27, 48, 49, 99).

A ressuscitação volêmica precoce é uma estratégia essencial no tratamento de choque séptico. A ressuscitação precoce com fluídos pode melhorar consideravelmente o prognóstico do paciente, reduzindo a mortalidade. Estudos prospectivos em pacientes com SDRA têm associado à estratégia de administração de volumes reduzida com a melhora da oxigenação e diminuição no número de dias dos pacientes em ventilação mecânica. Outros estudos sugerem que a infusão excessiva de fluídos leva a retenção de fluídos no espaço intersticial agravando a lesão pulmonar. Assim, a melhor conduta a ser adotada em pacientes com SDRA decorrente de sepse permanece um grande desafio para os médicos (4, 100).

A ressuscitação volêmica com solução salina hipertônica (NaCl, 7,5%) tem se mostrada efetiva na recuperação do volume plasmático e pressão arterial devido à mobilização de fluidos do espaço intracelular para compartimentos extracelulares. Alguns trabalhos mostram que a

hipertonicidade pode atuar também no sistema imunológico pela ativação de genes, regulação da expressão proteica, na ativação de quinases envolvidas na sinalização celular e na regulação de citocinas (101, 102).

No pulmão, o uso de solução hipertônica como terapia promove redução da lesão pulmonar após choque séptico e hemorrágico. Estudos mostram que a solução hipertônica reduz o acúmulo de neutrófilos e a lesão histopatológica no pulmão (80, 103).

5.2 - Efeitos do tratamento precoce com solução hipertônica

A resposta inflamatória exarcebada observada em pacientes com sepse, causa dano celular que muitas vezes leva o paciente a morte (34). Neste contexto, nossos resultados mostraram que os animais que receberam tratamento com solução hipertônica não morreram, diferentemente dos animais que foram injetados com LPS e não receberam tratamento e os animais que foram tratados com solução salina. Esse resultado sugere que o tratamento precoce com solução hipertônica é mais efetivo em controlar os efeitos da doença, evitando a mortalidade desses animais.

Nossos resultados vão de encontro com os observados por outros autores que mostraram que o tratamento de pacientes sépticos com solução hipertônica diminuiu a incidência de complicações e, conseqüentemente, a mortalidade desses pacientes (104, 105). Estes efeitos podem estar relacionados com a diminuição da resposta inflamatória, bem como diminuição da lesão tecidual.

A lesão pulmonar aguda tem como uma de suas características o surgimento de edema pulmonar. A relação de peso relativo dos órgãos expressa o acúmulo de líquido nos mesmos e, embora não seja um método

muito sensível, é de obtenção simples e confiável. A reposição volêmica com o uso de grandes volumes assim como processos inflamatórios graves está associada ao edema tecidual (106). Observamos que a indução da endotoxemia e o tratamento com solução salina aumentaram o edema pulmonar nos animais quando comparados ao grupo controle 24 horas após injeção do LPS, mostrando que a endotoxemia e a reposição volêmica com solução salina aumentam a quantidade de líquido extravascular pulmonar, possivelmente pela grande quantidade de líquido administrado.

O aumento do peso do pulmão indica um maior acúmulo de fluídos neste órgão, podendo levar a alterações funcionais, principalmente nas trocas gasosas, acarretando um comprometimento funcional (40). Assim, observamos que o tratamento precoce com menores volumes de solução hipertônica pode trazer benefícios importantes quanto ao comprometimento pulmonar de pacientes com SDRA. Alguns trabalhos relatam que o pico do edema pulmonar em animais endotoxêmicos ocorre 6 horas após a injeção de LPS, sendo gradualmente resolvido (40). Este fato pode estar relacionado com o nosso resultado sugerindo que os efeitos da reposição volêmica nesses animais poderiam ser mais evidentes em períodos mais precoces do que o estudado no presente trabalho. A endotoxemia é caracterizada por causar uma resposta inflamatória precoce e intensa no pulmão. Estudos mostram que 2 horas após a indução da endotoxemia observa-se a infiltração de células inflamatórias e o espessamento do septo alveolar dos animais, tendo seu pico em 24 horas (40).

Sabe-se que a endotoxemia pode ativar diretamente macrófagos, células endoteliais e o sistema complemento, desencadeando a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α , as interleucinas IL-1 β e IL-

6, o óxido nítrico, dentre outros, além da liberação de proteínas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4 e TGF- β (38). Nosso trabalho teve como objetivo principal analisar a ação do tratamento com solução hipertônica no processo de remodelamento tecidual, por este motivo, optou-se por analisar a citocina pró-inflamatória TNF- α e a anti-inflamatória IL-10 a fim de observarmos se o processo inflamatório também estaria sendo modulado pelo tratamento.

O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos e células T após estímulo por LPS e é considerado um potente ativador de macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. Elevadas concentrações de TNF- α tem sido relacionada com mortalidade em estudos experimentais de sepse (64). A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória responsável pela diminuição da produção de mediadores pró-inflamatório, inibição da proliferação de células T, além de proteger os animais em modelos de endotoxemia por LPS (38, 107).

Nossos resultados não mostraram diferenças entre os grupos em relação a produção de TNF- α e IL-10, 24 horas após indução da doença. No entanto, foi possível observar uma tendência do grupo tratado com hipertônica em modular favoravelmente os níveis destas citocinas através da diminuição do TNF- α e aumento da IL-10. Estudos mostram que as expressões de TNF- α e IL-10 apresentam uma resposta precoce, poucas horas após a indução da endotoxemia (40), assim possivelmente em períodos mais precoces poderíamos observar maiores diferenças entre os tratamentos. Rojas e colaboradores (40) mostraram que essas citocinas apresentam picos precoces, ocorrendo 2 horas após a indução da doença e retornando a valores basais após 24 horas. Esses resultados vão de encontro com os observados no presente trabalho.

Alterações na regulação da maquinaria enzimática envolvida na degradação da MEC é um fator que contribui para diversas patologias, dentre elas a lesão pulmonar aguda (61). Entre essas enzimas proteolíticas, destacamos as metaloproteinases (MMPs). As MMPs são necessárias para a degradação da MEC, mas vêm sendo relacionadas com a modulação do sistema imune através da liberação de proteínas apoptóticas e citocinas. Dentre as metaloproteinases, a MMP-9 apresenta um importante papel na lesão tecidual (108). A metaloproteinase 9 (MMP-9) é caracterizada pela habilidade em digerir colágenos, e sua ação tem sido relacionada com diversas patologias como inflamação, neurodegeneração e lesão pulmonar (60). A fim de observarmos se os resultados observados nos animais tratados com solução hipertônica estariam relacionados com a diminuição da lesão pulmonar, nós medimos sua expressão gênica e a atividade da MMP-9.

Observamos que os animais tratados com solução hipertônica apresentaram diminuição na expressão gênica e na atividade de MMP-9, quando comparados com os animais tratados com solução salina. Diversos trabalhos têm mostrado a importante ação que a MMP-9 desempenha na degradação do tecido pulmonar e consequente lesão a esse tecido (109, 110). A ação da MMP-9 seria responsável pela alteração na deposição de colágeno no tecido pulmonar levando ao processo de fibrose (109).

Estudos mostram que pacientes com SDRA induzidas por sepse apresentaram o dobro de colágeno em seus pulmões (50). Esse aumento na deposição de colágeno pode estar relacionado com as altas taxas de mortalidade observadas em pacientes com SDRA decorrente de uma progressiva disfunção respiratória (50). Dentre os diversos tipos de colágenos,

os colágenos tipo I e III estão entre os mais importantes para o tecido pulmonar. O colágeno do tipo I é uma fibra mais espessa, tendo como principal característica o aumento na tensão do tecido. O colágeno III, apresenta fibrilas mais finas que ao se agregarem formam fibras finas. Essas fibras formam a trama reticular flexível de órgãos parenquimatosos, como fígado, pâncreas e pulmão.

Observamos que o tratamento com solução hipertônica evitou a expressão de colágeno tipo I no pulmão dos animais, diferentemente do tratamento com solução salina, que não se mostrou efetivo nessa regulação. Quanto ao colágeno III, observamos que o tratamento com solução hipertônica evitou a sua diminuição, ao contrário do ocorrido nos animais que receberam LPS e dos animais que foram tratados com solução salina. No pulmão, o aumento na deposição de colágeno tipo I está relacionado com o aumento da resistência pulmonar, desencadeando importante prejuízo da função respiratória (111, 112). Alguns autores sugerem que durante a SDRA, há a substituição do colágeno III, mais flexível, pelo colágeno I, mais rígido, o que leva a diminuição da complacência pulmonar podendo o paciente necessitar de ventilação mecânica (44, 113). Assim o tratamento com solução hipertônica se mostra promissor em controlar esse desbalanço e, conseqüentemente, a disfunção pulmonar.

O reparo tecidual envolve a habilidade dos fibroblastos em agregar-se a matriz extracelular através de estruturas especializadas denominadas adesões focais, resultando na migração celular e contração da MEC (114). O mecanismo de adesão a MEC envolve integrinas, cujos sinais são transmitidos pela quinase de adesão focal, do inglês *focal adhesion kinase* (FAK). A

expressão de FAK está diretamente relacionada com a migração de fibroblastos para o tecido pulmonar (115). O aumento na sua expressão e atividade contribui para a formação de fibrose no tecido (115).

Nossos resultados mostraram que os animais que receberam injeção de LPS e os animais que receberam tratamento com solução salina tiveram um aumento significativo da atividade de FAK, porém quando os animais receberam tratamento com solução hipertônica houve inibição da atividade dessa proteína. Essa inativação pode estar relacionada com a diminuição na deposição de colágeno no tecido pulmonar dos animais tratados com hipertônica. Recentemente nosso grupo publicou dois trabalhos mostrando que a inativação da FAK através do uso de RNA de interferência diminuiu a deposição de colágeno no coração e no pulmão de ratos endotoxêmicos, sugerindo que essa via seria um importante alvo terapêutico nesta doença (56, 116).

Outros trabalhos relacionam a expressão de FAK com a produção de metaloproteinase 9, onde mostram que o papel da FAK na migração de células estaria relacionada com a degradação da MEC pela ação das metaloproteinases (117, 118). Assim, uma possível explicação para o aumento na expressão e atividade de MMP-9 observada em nosso trabalho poderia ser resultado do aumento na expressão de FAK ocorrida nos animais endotoxêmicos e nos animais que receberam solução salina. Juntos esses resultados mostram que a diminuição na deposição de colágeno observada nos animais que receberam solução hipertônica poderia estar ocorrendo através dessa via.

Baseado nos resultados da literatura e em nossos resultados, decidimos estudar a via pela qual a solução hipertônica estaria atuando durante este processo.

Inicialmente avaliamos se o aumento da osmolaridade estaria inibindo a ativação da FAK nos fibroblastos. Nossos resultados mostraram que quando os fibroblastos são mantidos em meio de cultura com solução hipertônica ocorre um aumento na ativação da FAK. Dentre as funções conhecidas da FAK, destaca-se sua ação como mediadora dos sinais do ambiente extracelular para o intracelular a partir das integrinas. Sua ativação está relacionada com a mecanotransdução, decorrente do estresse sofrido pela célula (90). Assim, nossos resultados sugerem que a inativação da FAK pela solução hipertônica não ocorreu por ação direta sobre o citoesqueleto da célula, sendo sua inibição resultado da ação de outras vias envolvidas no processo de remodelamento tecidual.

Estudos recentes têm demonstrado que a ativação da FAK pode ocorrer em resposta à migração neutrofílica e que este processo é dependente do óxido nítrico (NO) (119-121). A fim de observarmos se a inativação da FAK ocorrida no tecido dos animais que receberam hipertônica estaria relacionada à diminuição do NO, nós medimos a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no tecido pulmonar e o nitrito, um subproduto do NO, no plasma. Nossos resultados mostraram que o tratamento com solução hipertônica inibiu tanto a expressão de iNOS no tecido como o nitrito no plasma dos animais.

Em estudo recente, observou-se que a ativação da FAK poderia ocorrer durante o processo de infiltração dos neutrófilos no tecido, através da ativação de moléculas de adesão (121). Sabe-se que o acúmulo de neutrófilos no

pulmão ocorre através da sinalização de moléculas efetoras como radicais livres, citocinas e o óxido nítrico (NO) (65, 69). A síntese de NO se diferencia em quantidade e tempo de liberação em decorrência do tipo de NO sintase ativa. A forma induzida (iNOS) sintetiza NO em grandes quantidades durante os processos inflamatórios. Este fato acarreta em um aumento da ativação de neutrófilos e macrófagos (122). Embora não foi possível quantificar a infiltração neutrofílica em nosso trabalho, Está amplamente consolidado na literatura que dentre as ações desempenhadas pela solução hipertônica, a diminuição na infiltração neutrofílica no tecido está amplamente estabelecida (73, 123). Assim, nossos resultados sugerem que a diminuição na deposição de colágeno no tecido pulmonar através da inativação da FAK observada nos animais tratados com solução hipertônica, estaria relacionada com a diminuição do NO e, conseqüentemente, com a possível diminuição na infiltração de neutrófilos no tecido. Esse resultado pode explicar também, a diminuição na expressão e atividade da metaloproteinase 9 (MMP-9) observada no tecido. Os neutrófilos são as principais células secretoras de MMP-9, as quais estão presentes na forma latente em seus grânulos. Assim, com a diminuição da infiltração de neutrófilos ocorre menor liberação de MMP-9 o que leva a conseqüente diminuição da lesão tecidual.

Dentre as características da lesão pulmonar aguda observamos uma fase fibroproliferativa com deposição de colágeno e conseqüente perda da função pulmonar (124). Através das análises de mecânica pulmonar, observamos que o tratamento com solução hipertônica diminuiu a resistência do tecido pulmonar dos animais endotoxêmicos e a solução salina foi responsável por um aumento da elastância no tecido. Esses resultados vão de

encontro ao esperado, levando em consideração a diminuição na deposição de colágeno observada nos animais tratados com solução hipertônica. Diversos trabalhos têm demonstrado que o aumento na deposição de fibras colágenas no tecido pulmonar estaria relacionado com as alterações observadas na resistência e elastância do tecido pulmonar (109, 113, 125). Conseqüentemente, pacientes com SDRA apresentam alterações nos parâmetros de mecânica pulmonar, não respondendo normalmente às manobras de recrutamento (126).

Sabe-se que grande parte dos pacientes sépticos que adentram a UTI apresentam diminuição da função pulmonar necessitando de ventilação mecânica. Diversos trabalhos mostraram que a ventilação mecânica pode ser responsável pelo aumento da lesão do tecido pulmonar, levando a um aumento na deposição de colágeno no tecido (39, 127). Nossos resultados confirmaram o potencial terapêutico que a solução hipertônica apresenta. Observamos que o tratamento com solução hipertônica pode evitar a necessidade de utilização da ventilação mecânica, diminuindo a incidência de complicações pulmonares decorrentes da sua utilização.

5.3 - Efeitos do tratamento tardio com solução hipertônica

A grande dificuldade na reprodutibilidade dos resultados encontrados em modelos animais que recebem tratamento com solução hipertônica quando aplicados em pacientes está relacionada ao período no qual se realiza o tratamento.

A ação benéfica da solução hipertônica quando administrada em períodos precoces da doença está amplamente consolidada, porém diversos trabalhos realizados com pacientes não tem mostrado resultados semelhantes.

Alguns autores sugerem que mais importante que o tipo de fluído utilizado seria o horário de sua administração (128, 129).

A fim de observarmos se o tratamento tardio de animais endotoxêmicos mostraria resultados diferentes aos observados em animais tratados em períodos precoces da indução da doença, analisamos a ação da solução hipertônica 1,5 horas após a indução da doença. Neste período no qual grande parte dos mediadores inflamatórios apresenta sua expressão máxima.

Nossos resultados mostraram que o tratamento tardio com solução hipertônica, não foi capaz de evitar a mortalidade dos animais endotoxêmicos, mostrando-se pior que o tratamento com solução salina. Esses resultados podem explicar a ausência de resultados positivos quanto à mortalidade de pacientes sépticos quando tratados com solução hipertônica. Sabe-se da dificuldade de se administrar precocemente volume na prática clínica.

Em trabalho publicado por Gao e colaboradores (130), onde foi comparado duas estratégias de administração de volume em pacientes sépticos, sendo uma delas precoce e a outra tardia, observou-se que aqueles pacientes tratados precocemente apresentaram grande diminuição na mortalidade quando comparado aos pacientes tratados tardiamente. Mais recentemente, o estudo prospectivo randomizado publicado por van Haren e colaboradores (131), embora tenha mostrado melhora da microcirculação de pacientes sépticos, não mostrou benefícios da solução hipertônica em alterar a taxa de mortalidade destes pacientes.

Quanto ao edema pulmonar, como observamos com o tratamento precoce, não houve diminuição expressiva na porcentagem de água no pulmão

dos animais de ambos os tratamentos. A falta de diferença pode estar relacionada com o período de estudo.

Alguns trabalhos mostraram que o tratamento precoce com solução hipertônica reduz o dano ao tecido pulmonar enquanto que o tratamento tardio aumenta significativamente o estresse oxidativo e o acúmulo de neutrófilos polimorfonucleares no pulmão, agravando a lesão do tecido pulmonar após a sepse (101, 132).

Nossos resultados mostraram que 1,5 horas após o tratamento dos animais endotoxêmicos, ao contrário do que ocorreu nos animais tratados precocemente, houve um aumento na expressão e atividade de MMP-9 no tecido pulmonar dos animais tratados com solução hipertônica ou solução salina. Esses resultados sugerem que os tratamentos tardios podem aumentar a lesão tecidual devido ao aumento na atividade da MMP-9. Possivelmente este evento se deve a um maior acúmulo de células inflamatórias no tecido.

Inoue e colaboradores (132) mostraram que o tratamento tardio com solução hipertônica de animais sépticos foi responsável pelo aumento na infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar, quando comparado aos animais que receberam o tratamento 15 minutos após a indução da doença. Outros trabalhos mostraram resultados semelhantes, indicando que o tratamento com solução hipertônica pode ter efeitos contrários como ativação ou inibição de neutrófilos, dependendo do período de administração sendo ineficaz quando administrada após a ativação dos neutrófilos (133, 134). Portanto, esses resultados sugerem que o tratamento tardio da doença poderia causar o aumento na infiltração de células inflamatórias no tecido pulmonar podendo aumentar a lesão tecidual.

Com relação à deposição de colágenos no tecido pulmonar, observamos uma tendência em aumentar a deposição de colágeno I e diminuir o colágeno III nos animais que receberam tratamento, embora essas diferenças não sejam significativas.

O desbalanço na atividade da MMP-9 leva a um aumento na deposição de proteínas da matriz extracelular, dentre elas o colágeno, tendo como consequência a fibrose (135). Junger e colaboradores (93) mostraram que o tratamento tardio com hipertônica, além de ativar os neutrófilos, fez com que a liberação de elastases fosse aumentada levando ao aumento da lesão tecidual. Assim, nossos achados mostram que o aumento na expressão de MMP-9 no tecido pode estar desencadeando uma lesão do tecido e, conseqüentemente, alterações na deposição de colágeno.

Como vimos nos resultados do tratamento precoce com hipertônica, a deposição de colágenos está relacionada com o aumento na expressão da FAK em resposta, possivelmente, ao aumento de neutrófilos e síntese do óxido nítrico. Assim, quantificamos essa proteína e os agentes envolvidos na sua via de ativação a fim de confirmar a ação da solução hipertônica.

Observamos que o tratamento tardio com reposição volêmica aumentou a síntese de óxido nítrico e, conseqüentemente, a ativação da FAK no tecido pulmonar o que poderia estar relacionado com o aumento na deposição de colágeno no tecido. Esses resultados vão de encontro com nossos achados de aumento na deposição do colágeno tipo I, mostrando que o tratamento com hipertônica evitaria a substituição do colágeno III, mais elástico, pelo colágeno I o que seria responsável pela diminuição da função pulmonar.

Como esperado, os parâmetros de mecânica respiratória seguiram os resultados da deposição de colágeno no tecido. Embora observamos uma tendência em aumentar a resistência e a elastância do tecido, os resultados não foram significativamente diferentes. A região do parênquima pulmonar é onde se observa a maior deposição de colágeno e esta deposição é um evento descrito como diretamente relacionado com a perda da função pulmonar (127, 136).

Assim, estes resultados enfatizam a linha de conduta atual em terapia intensiva de tratamento o mais precoce possível, sugerindo que o tratamento tardio poderia aumentar a necessidade da utilização de ventilação mecânica em pacientes com SDRA em decorrência da sepse, levando a piora do prognóstico destes pacientes (34, 137).

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- O tratamento precoce com solução hipertônica evitou a mortalidade de ratos endotoxêmicos, diminuindo a lesão tecidual e a deposição de colágeno no tecido pulmonar dos animais endotoxêmicos 24 horas após o tratamento, inibindo a via da FAK possivelmente devido a diminuição da produção de óxido nítrico.
- A mecânica pulmonar dos animais induzidos a endotoxemia e/ou tratados 15 minutos após indução da doença apresentaram diminuição na resistência e elastância no tecido pulmonar quando comparados aos animais tratados com solução hipertônica.
- O tratamento tardio, realizado 1,5 horas após indução da doença, se mostrou prejudicial, pois não evitou a mortalidade e levou ao dano do tecido pulmonar, através do aumento na expressão e atividade de MMP-9 e desbalanço na deposição dos colágenos tipo I e colágeno tipo III.
- Quando administrada tardiamente, a solução hipertônica não conseguiu modular favoravelmente a via da FAK induzida por óxido nítrico, aumentando a fibrose pulmonar e, conseqüentemente, piorando os parâmetros de mecânica pulmonar.
- Nossos resultados mostram dois aspectos fundamentais da solução hipertônica: A via de ação do tratamento precoce com solução hipertônica no remodelamento pulmonar através da inibição da FAK e a janela terapêutica da solução hipertônica. Este último aspecto pode explicar a dificuldade encontrada em reproduzir os efeitos benéficos do tratamento com solução hipertônica em pacientes, mostrando que o tempo de administração da solução hipertônica é crucial para sua ação terapêutica.

REFERÊNCIAS

7. Rereferências

1. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004 Aug;8(4):R251-60.
2. Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal SM, 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 Jan;28(1):232-5.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7):1303-10.
4. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. 2012 Feb;39(2):165-228.
5. Cipolle MD, Pasquale MD, Cerra FB. Secondary organ dysfunction. From clinical perspectives to molecular mediators. *Crit Care Clin*. 1993 Apr;9(2):261-98.
6. Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*. 1984 Apr;100(4):483-90.
7. Parker MM, Ognibene FP, Parrillo JE. Peak systolic pressure/end-systolic volume ratio, a load-independent measure of ventricular function, is reversibly decreased in human septic shock. *Crit Care Med*. 1994 Dec;22(12):1955-9.
8. Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC, Erlich JH, Gerondakis S, Mackman N, et al. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest*. 1998 Nov 1;102(9):1645-52.
9. Moore FA, Moore EE, Read RA. Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome. *New Horiz*. 1993 Nov;1(4):538-49.
10. Bone RC. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann Intern Med*. 1991 Feb 15;114(4):332-3.
11. Christians ES, Yan LJ, Benjamin IJ. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners in protection against acute cell injury. *Crit Care Med*. 2002 Jan;30(1 Supp):S43-S50.
12. Salvo I, de Cian W, Musicco M, Langer M, Piadena R, Wolfler A, 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 Nov;21 Suppl 2:S244-9.

13. Vincent JL. Update on sepsis: pathophysiology and treatment. *Acta Clin Belg.* 2000 Mar-Apr;55(2):79-87.

14. Pollack M, Ohi CA. Endotoxin-based molecular strategies for the prevention and treatment of gram-negative sepsis and septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;216:275-97.

15. Grinnell BW, Joyce D. Recombinant human activated protein C: a system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S53-60; discussion S-1.

16. João Andrade L, Sales Júnior CMD, Rodrigo Hatum, Paulo César S. P. Souza, André Japiassú, Cleovaldo T. S. Pinheiro GF, Odin Barbosa da Silva, Mariza D'Agostino Dias, Edwin Koterba, Fernando Suparregui Dias CP. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Revista Brasileira Terapia Intensiva.* 2006;18:9-17.

17. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med.* 2001 Nov 8;345(19):1359-67.

18. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001 Nov 8;345(19):1368-77.

19. Annane D. Glucocorticoids in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care.* 2005 Oct;11(5):449-53.

20. Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am J Physiol.* 1997 Jun;272(6 Pt 2):R1712-25.

21. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000 Aug 3;343(5):338-44.

22. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol.* 1998 Feb;10(1):12-5.

23. Skidmore BJ, Chiller JM, Morrison DC, Weigle WO. Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities. *J Immunol.* 1975 Feb;114(2 pt 2):770-5.

24. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med.* 1993 Oct;21(10 Suppl):S447-63.

25. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000 Feb;173:89-97.
26. Kaisho T, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.* 2001 Feb;22(2):78-83.
27. Marshall R, Bellingan G, Laurent G. The acute respiratory distress syndrome: fibrosis in the fast lane. *Thorax.* 1998 Oct;53(10):815-7.
28. Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007 Aug;20(4):345-52.
29. Soriano FG, Nogueira AC, Caldini EG, Lins MH, Teixeira AC, Cappi SB, et al. Potential role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Crit Care Med.* 2006 Apr;34(4):1073-9.
30. Vincent JL, Sun Q, Dubois MJ. Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. *Clin Infect Dis.* 2002 Apr 15;34(8):1084-93.
31. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, et al. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;216:39-81.
32. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med.* 1999 Jan 21;340(3):207-14.
33. Matsuda N, Hattori Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci.* 2006 Jul;101(3):189-98.
34. Christensen VB, Nielsen JS, Tonnesen EK. [Sepsis in the critically-ill patient]. *Ugeskr Laeger.* 2007 Feb 19;169(8):703-5.
35. Chung TP, Laramie JM, Province M, Cobb JP. Functional genomics of critical illness and injury. *Crit Care Med.* 2002 Jan;30(1 Suppl):S51-7.
36. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2000 Jul 13;343(2):108-17.
37. Philippart F, Cavillon JM. Sepsis mediators. *Curr Infect Dis Rep.* 2007 Sep;9(5):358-65.
38. Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med.* 2007 Mar-Apr;22(2):63-72.

39. Balibrea JL, Arias-Diaz J. Acute respiratory distress syndrome in the septic surgical patient. *World J Surg.* 2003 Dec;27(12):1275-84.
40. Rojas M, Woods CR, Mora AL, Xu J, Brigham KL. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Feb;288(2):L333-41.
41. Martin GS, Eaton S, Mealer M, Moss M. Extravascular lung water in patients with severe sepsis: a prospective cohort study. *Crit Care.* 2005 Apr;9(2):R74-82.
42. Guo RF, Ward PA. Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antioxid Redox Signal.* 2007 Nov;9(11):1991-2002.
43. Murao Y, Loomis W, Wolf P, Hoyt DB, Junger WG. Effect of dose of hypertonic saline on its potential to prevent lung tissue damage in a mouse model of hemorrhagic shock. *Shock.* 2003 Jul;20(1):29-34.
44. Uhlig S, Brasch F, Wollin L, Fehrenbach H, Richter J, Wendel A. Functional and fine structural changes in isolated rat lungs challenged with endotoxin ex vivo and in vitro. *Am J Pathol.* 1995 May;146(5):1235-47.
45. Czermak BJ, Breckwoldt M, Ravage ZB, Huber-Lang M, Schmal H, Bless NM, et al. Mechanisms of enhanced lung injury during sepsis. *Am J Pathol.* 1999 Apr;154(4):1057-65.
46. Barbarin V, Nihoul A, Misson P, Arras M, Delos M, Leclercq I, et al. The role of pro- and anti-inflammatory responses in silica-induced lung fibrosis. *Respir Res.* 2005;6:112.
47. Torry DJ, Richards CD, Podor TJ, Gauldie J. Anchorage-independent colony growth of pulmonary fibroblasts derived from fibrotic human lung tissue. *J Clin Invest.* 1994 Apr;93(4):1525-32.
48. Suki B, Ito S, Stamenovic D, Lutchen KR, Ingenito EP. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. *J Appl Physiol.* 2005 May;98(5):1892-9.
49. Buttenschoen K, Kornmann M, Berger D, Leder G, Beger HG, Vasilescu C. Endotoxemia and endotoxin tolerance in patients with ARDS. *Langenbecks Arch Surg.* 2008 Jul;393(4):473-8.
50. Santos FB, Nagato LK, Boechem NM, Negri EM, Guimaraes A, Capelozzi VL, et al. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *J Appl Physiol.* 2006 Jan;100(1):98-106.
51. Wei W, Ma B, Li HY, Jia Y, Lv K, Wang G, et al. Biphasic effects of selective inhibition of transforming growth factor beta1 activin receptor-like kinase on LPS-induced lung injury. *Shock.* Feb;33(2):218-24.

52. Vittal R, Horowitz JC, Moore BB, Zhang H, Martinez FJ, Toews GB, et al. Modulation of prosurvival signaling in fibroblasts by a protein kinase inhibitor protects against fibrotic tissue injury. *Am J Pathol*. 2005 Feb;166(2):367-75.
53. Cox BD, Natarajan M, Stettner MR, Gladson CL. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J Cell Biochem*. 2006 Sep 1;99(1):35-52.
54. Mian MF, Kang C, Lee S, Choi JH, Bae SS, Kim SH, et al. Cleavage of focal adhesion kinase is an early marker and modulator of oxidative stress-induced apoptosis. *Chem Biol Interact*. 2008 Jan 10;171(1):57-66.
55. Lagares D, Busnadiego O, Garcia-Fernandez RA, Kapoor M, Liu S, Carter DE, et al. Inhibition of focal adhesion kinase prevents experimental lung fibrosis and myofibroblast formation. *Arthritis Rheum*. 2012 May;64(5):1653-64.
56. Petroni RC, Teodoro WR, Guido MC, Barbeiro HV, Abatepaulo F, Theobaldo MC, et al. Role of focal adhesion kinase in lung remodeling of endotoxemic rats. *Shock*. 2012 May;37(5):524-30.
57. Pelosi P, Rocco PR, Negrini D, Passi A. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. *An Acad Bras Cienc*. 2007 Jun;79(2):285-97.
58. Vanlaere I, Libert C. Matrix metalloproteinases as drug targets in infections caused by gram-negative bacteria and in septic shock. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Apr;22(2):224-39, Table of Contents.
59. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med*. 1999 Feb;31(1):34-45.
60. Tandon A, Sinha S. Structural insights into the binding of MMP9 inhibitors. *Bioinformation*.5(8):310-4.
61. Davey A, McAuley DF, O'Kane CM. Matrix metalloproteinases in acute lung injury: mediators of injury and drivers of repair. *Eur Respir J*. Oct;38(4):959-70.
62. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):617-29.
63. Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Jul;33(7):749-54.
64. Muhs BE, Patel S, Yee H, Marcus S, Shamamian P. Increased matrix metalloproteinase expression and activation following experimental acute pancreatitis. *J Surg Res*. 2001 Nov;101(1):21-8.

65. Arkovitz MS, Wispe JR, Garcia VF, Szabo C. Selective inhibition of the inducible isoform of nitric oxide synthase prevents pulmonary transvascular flux during acute endotoxemia. *J Pediatr Surg*. 1996 Aug;31(8):1009-15.
66. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992 Sep;6(12):3051-64.
67. Parratt JR. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother*. 1998 Jan;41 Suppl A:31-9.
68. Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2-3):437-55.
69. Numata M, Suzuki S, Miyazawa N, Miyashita A, Nagashima Y, Inoue S, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J Immunol*. 1998 Mar 15;160(6):3031-7.
70. Rice TW, Bernard GR. Therapeutic intervention and targets for sepsis. *Annu Rev Med*. 2005;56:225-48.
71. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*. 2003 May;9(5):517-24.
72. Shih CC, Chen SJ, Chen A, Wu JY, Liaw WJ, Wu CC. Therapeutic effects of hypertonic saline on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Crit Care Med*. 2008 Jun;36(6):1864-72.
73. Staudenmayer KL, Maier RV, Jelacic S, Bulger EM. Hypertonic saline modulates innate immunity in a model of systemic inflammation. *Shock*. 2005 May;23(5):459-63.
74. Roch A, Guervilly C, Papazian L. Fluid management in acute lung injury and ards. *Ann Intensive Care*. 2011;1(1):16.
75. Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR, Thompson BT, Hayden D, deBoisblanc B, et al. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med*. 2006 Jun 15;354(24):2564-75.
76. Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hishiyama S, Noguchi T. Danaparoid sodium inhibits systemic inflammation and prevents endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Crit Care*. 2008;12(2):R43.
77. Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M, Jr., Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol*. 1980 Nov;239(5):H664-73.
78. Junger WG, Coimbra R, Liu FC, Herdon-Remelius C, Junger W, Junger H, et al. Hypertonic saline resuscitation: a tool to modulate immune function in trauma patients? *Shock*. 1997 Oct;8(4):235-41.

79. Oliveira RP, Velasco I, Soriano F, Friedman G. Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Crit Care*. 2002 Oct;6(5):418-23.
80. Oliveira RP, Velasco I, Soriano FG, Friedman G. Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Crit Care*. 2002 Oct;6(5):418-23.
81. Wade C, Grady J, Kramer G. Efficacy of hypertonic saline dextran (HSD) in patients with traumatic hypotension: meta-analysis of individual patient data. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1997;110:77-9.
82. Wade CE, Grady JJ, Kramer GC. Efficacy of hypertonic saline dextran fluid resuscitation for patients with hypotension from penetrating trauma. *J Trauma*. 2003 May;54(5 Suppl):S144-8.
83. Wade CE, Grady JJ, Kramer GC, Younes RN, Gehlsen K, Holcroft JW. Individual patient cohort analysis of the efficacy of hypertonic saline/dextran in patients with traumatic brain injury and hypotension. *J Trauma*. 1997 May;42(5 Suppl):S61-5.
84. Wade CE, Kramer GC, Grady JJ, Fabian TC, Younes RN. Efficacy of hypertonic 7.5% saline and 6% dextran-70 in treating trauma: a meta-analysis of controlled clinical studies. *Surgery*. 1997 Sep;122(3):609-16.
85. Mattox KL, Maningas PA, Moore EE, Mateer JR, Marx JA, Aprahamian C, et al. Prehospital hypertonic saline/dextran infusion for post-traumatic hypotension. The U.S.A. Multicenter Trial. *Ann Surg*. 1991 May;213(5):482-91.
86. Ciesla DJ, Moore EE, Biffl WL, Gonzalez RJ, Silliman CC. Hypertonic saline attenuation of neutrophil cytotoxic response is reversed hypertonic challenge. *Surgery*. 2001;129:567-75.
87. Orlic T, Loomis WH, Shreve A, Namiki S, Junger WG. Hypertonicity increases cAMP in PMN and blocks oxidative burst by PKA-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Jun;282(6):C1261-9.
88. Kramer G, Eljjo G, Poli de Figueiredo LF, Wade C. HYPEROSMOTIC-HYPERONCOTIC SOLUTIONS. *Clinical Anesthesiology*. 1997;11:147-60.
89. Rizoli SB, Kapus A, Fan J, Li YH, Marshall JC, Rotstein OD. Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *J Immunol*. 1998 Dec 1;161(11):6288-96.
90. Powers KA, Woo J, Khadaroo RG, Papia G, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock upregulates the anti-inflammatory response by alveolar macrophages. *Surgery*. 2003 Aug;134(2):312-8.

91. Papia G, Burrows LL, Sinnadurai S, Marshall JC, Tawadros PS, Kapus A, et al. Hypertonic saline resuscitation from hemorrhagic shock does not impair the neutrophil response to intraabdominal infection. *Surgery*. 2008 Nov;144(5):814-21.
92. Rizoli SB, Kapus A, Parodo J, Rotstein OD. Hypertonicity prevents lipopolysaccharide-stimulated CD11b/CD18 expression in human neutrophils in vitro: role for p38 inhibition. *J Trauma*. 1999 May;46(5):794-8; discussion 8-9.
93. Junger WG, Hoyt DB, Davis RE, Herdon-Remelius C, Namiki S, Junger H, et al. Hypertonicity regulates the function of human neutrophils by modulating chemoattractant receptor signaling and activating mitogen-activated protein kinase p38. *J Clin Invest*. 1998 Jun 15;101(12):2768-79.
94. Yu G, Chi X, Hei Z, Shen N, Chen J, Zhang W, et al. Small volume resuscitation with 7.5% hypertonic saline, hydroxyethyl starch 130/0.4 solution and hypertonic sodium chloride hydroxyethyl starch 40 injection reduced lung injury in endotoxin shock rats: comparison with saline. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012 Feb;25(1):27-32.
95. Kim HW, Breiding P, Greenburg AG. Enhanced modulation of hypotension in endotoxemia by concomitant nitric oxide synthesis inhibition and nitric oxide scavenging. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1997 Jan-Mar;25(1-2):153-62.
96. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
97. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
98. Shi DW, Zhang J, Jiang HN, Tong CY, Gu GR, Ji Y, et al. LPS pretreatment ameliorates multiple organ injuries and improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis. *Inflamm Res*. Sep;60(9):841-9.
99. Chapman HA. Disorders of lung matrix remodeling. *J Clin Invest*. 2004 Jan;113(2):148-57.
100. Liu W, Shan LP, Dong XS, Liu XW, Ma T, Liu Z. Effect of early fluid resuscitation on the lung in a rat model of lipopolysaccharide-induced septic shock. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013 Jan;17(2):161-9.
101. Thiel M, Buessecker F, Eberhardt K, Chouker A, Setzer F, Kreimeier U, et al. Effects of hypertonic saline on expression of human polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules. *J Leukoc Biol*. 2001 Aug;70(2):261-73.
102. Powers KA, Zurawska J, Szaszi K, Khadaroo RG, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock prevents alveolar macrophage

activation by preventing systemic oxidative stress due to gut ischemia/reperfusion. *Surgery*. 2005 Jan;137(1):66-74.

103. Gurfinkel V, Poggetti RS, Fontes B, da Costa Ferreira Novo F, Birolini D. Hypertonic saline improves tissue oxygenation and reduces systemic and pulmonary inflammatory response caused by hemorrhagic shock. *J Trauma*. 2003 Jun;54(6):1137-45.

104. Zhu GC, Quan ZY, Shao YS, Zhao JG, Zhang YT. [The study of hypertonic saline and hydroxyethyl starch treating severe sepsis]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. Mar;23(3):150-3.

105. Chopra A, Kumar V, Dutta A. Hypertonic versus normal saline as initial fluid bolus in pediatric septic shock. *Indian J Pediatr*. Jul;78(7):833-7.

106. Imm A, Carlson RW. Fluid resuscitation in circulatory shock. *Crit Care Clin*. 1993 Apr;9(2):313-33.

107. Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995 Sep;2(5):549-53.

108. Keck T, Balcom JHt, Fernandez-del Castillo C, Antoniu BA, Warshaw AL. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):188-201.

109. Davey A, McAuley DF, O'Kane CM. Matrix metalloproteinases in acute lung injury: mediators of injury and drivers of repair. *Eur Respir J*. 2011 Oct;38(4):959-70.

110. Dooley JL, Abdel-Latif D, St Laurent CD, Puttagunta L, Befus D, Lacy P. Regulation of inflammation by Rac2 in immune complex-mediated acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Dec;297(6):L1091-102.

111. Dos Santos CC. Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury. *Intensive Care Med*. 2008 Apr;34(4):619-30.

112. Rocco PR, Negri EM, Kurtz PM, Vasconcellos FP, Silva GH, Capelozzi VL, et al. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Sep 15;164(6):1067-71.

113. Faffe DS, Seidl VR, Chagas PS, Goncalves de Moraes VL, Capelozzi VL, Rocco PR, et al. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. *Eur Respir J*. 2000 Jan;15(1):85-91.

114. Clemente CF, Tornatore TF, Theizen TH, Deckmann AC, Pereira TC, Lopes-Cendes I, et al. Targeting focal adhesion kinase with small interfering

RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res.* 2007 Dec 7;101(12):1339-48.

115. Cai GQ, Zheng A, Tang Q, White ES, Chou CF, Gladson CL, et al. Downregulation of FAK-related non-kinase mediates the migratory phenotype of human fibrotic lung fibroblasts. *Exp Cell Res.* May 15;316(9):1600-9.

116. Guido MC CC, Moretti AI, Barbeiro HV, Debbas V, Caldini EG, Franchini KG, Soriano FG. Small Interfering RNA target focal adhesion kinase prevents cardiac dysfunction in endotoxemia. *shock.* 2011:Epub ahead of print.

117. Siesser PM, Hanks SK. The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3233-7.

118. Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR, Streblow DN, Nelson JA, Ilic D, et al. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol.* 2003 Mar 3;160(5):753-67.

119. Hsu YC, Wang LF, Chien YW. Nitric oxide in the pathogenesis of diffuse pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med.* 2007 Mar 1;42(5):599-607.

120. Maa MC, Chang MY, Li J, Li YY, Hsieh MY, Yang CJ, et al. The iNOS/Src/FAK axis is critical in Toll-like receptor-mediated cell motility in macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1813(1):136-47.

121. Yuan SY, Shen Q, Rigor RR, Wu MH. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvasc Res.* 2012 Jan;83(1):82-8.

122. Vo PA, Lad B, Tomlinson JA, Francis S, Ahluwalia A. autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function. *J Biol Chem.* 2005 Feb 25;280(8):7236-43.

123. Poli-de-Figueiredo LF, Cruz RJ, Jr., Sannomiya P, Rocha ESM. Mechanisms of action of hypertonic saline resuscitation in severe sepsis and septic shock. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2006 Jun;6(2):201-6.

124. Tsushima K, King LS, Aggarwal NR, De Gorordo A, D'Alessio FR, Kubo K. Acute lung injury review. *Intern Med.* 2009;48(9):621-30.

125. Faffe DS, Zin WA. Lung parenchymal mechanics in health and disease. *Physiol Rev.* 2009 Jul;89(3):759-75.

126. Costa EL, Schettino IA, Schettino GP. The lung in sepsis: guilty or innocent? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2006 Jun;6(2):213-6.

127. Leite-Junior JH, Garcia CS, Souza-Fernandes AB, Silva PL, Ornellas DS, Larangeira AP, et al. Methylprednisolone improves lung mechanics and

reduces the inflammatory response in pulmonary but not in extrapulmonary mild acute lung injury in mice. *Crit Care Med*. 2008 Sep;36(9):2621-8.

128. Vincent JL, Gottin L. Type of fluid in severe sepsis and septic shock. *Minerva Anestesiol*. 2011 Dec;77(12):1190-6.

129. Shih CC, Tsai MF, Chen SJ, Tsao CM, Ka SM, Huang HC, et al. Effects of small-volume hypertonic saline on acid-base and electrolytes balance in rats with peritonitis-induced sepsis. *Shock*. 2012 Dec;38(6):649-55.

130. Gao J, Zhao WX, Xue FS, Zhou LJ, Yu YH, Zhou HB. Effects of different resuscitation fluids on acute lung injury in a rat model of uncontrolled hemorrhagic shock and infection. *J Trauma*. 2009 Dec;67(6):1213-9.

131. van Haren FM, Sleight J, Boerma EC, La Pine M, Bahr M, Pickkers P, et al. Hypertonic fluid administration in patients with septic shock: a prospective randomized controlled pilot study. *Shock*. 2011 Mar;37(3):268-75.

132. Inoue Y, Chen Y, Pauzenberger R, Hirsh MI, Junger WG. Hypertonic saline up-regulates A3 adenosine receptor expression of activated neutrophils and increases acute lung injury after sepsis. *Crit Care Med*. 2008 Sep;36(9):2569-75.

133. Murao Y, Hoyt DB, Loomis W, Namiki S, Patel N, Wolf P, et al. Does the timing of hypertonic saline resuscitation affect its potential to prevent lung damage? *Shock*. 2000 Jul;14(1):18-23.

134. Hashiguchi N, Lum L, Romeril E, Chen Y, Yip L, Hoyt DB, et al. Hypertonic saline resuscitation: efficacy may require early treatment in severely injured patients. *J Trauma*. 2007 Feb;62(2):299-306.

135. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar 8;533(1-3):133-44.

136. Davidson KG, Bersten AD, Barr HA, Dowling KD, Nicholas TE, Doyle IR. Endotoxin induces respiratory failure and increases surfactant turnover and respiration independent of alveolocapillary injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jun 1;165(11):1516-25.

137. Wiersinga WJ, van der Poll T. [Sepsis: new insights into its pathogenesis and treatment]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 154:A1130.