

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**EFEITO DA SINVASTATINA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE**

**FLORA MAGNO DE JESUS OLIVEIRA**  
Rio de Janeiro  
2011



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular

***FLORA MAGNO DE JESUS OLIVEIRA***

**EFEITO DA SINVASTATINA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE**

Dissertação apresentada ao Instituto  
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências

Orientador(es): Dr<sup>a</sup>. Adriana Ribeiro Silva  
Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto  
Co-orientador: Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque

Rio de Janeiro  
2011

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O482

Oliveira, Flora Magno de Jesus .

Efeito da sinvastatina em um modelo experimental de sepse / Flora Magno de Jesus Oliveira. – Rio de Janeiro, 2011.  
xiv, 63 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.  
Bibliografia: f. 53-63

1. Sepse. 2. Estatinas. 3. Óxido nítrico. I. Título.

CDD 616.944



**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular**

***FLORA MAGNO DE JESUS OLIVEIRA***

**EFEITO DA SINVASTATINA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE**

Orientador(es): Dr<sup>a</sup>. Adriana Ribeiro Silva  
Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto  
Co-orientador: Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque

Aprovada em: 29/09/11

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup>. Rachel Novaes Gomes – IOC – FIOCRUZ  
Presidente

---

Dr<sup>a</sup> Patrícia Burth – DBCM – UFF  
Membro

---

Dr<sup>a</sup> Carmen Penido Monteiro – Farmanguinhos – FIOCRUZ  
Membro

---

Dr<sup>a</sup>. Patrícia Reis – IOC – FIOCRUZ  
Membro Suplente e Revisora

---

Dr<sup>a</sup> Clarissa Maya Monteiro – IOC – FIOCRUZ  
Membro suplente

**Rio de Janeiro  
2011**

*Même si vos démarches semblent inutiles, s'impose comme l'eau qui coule le chant de montagne.*

*D'autres vous suivront...*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Márcia, pelo amor incondicional e carinho, “chazinhos” de camomila e massagens nos momentos tensos e pelos beijos de boa noite.

Ao meu pai, homem mais culto que conheço, por sempre acreditar em mim, e pelas conversas filosóficas no carro que sempre me acrescentam algo mais.

À minha família, por torcerem sempre pelo meu sucesso.

À minha segunda família, Zeza, Li, Dê e Vi, pessoas essenciais na minha vida, que mesmo longe, sei que posso contar a qualquer hora, dia e momento.

Ao Moisés, meu namorado e melhor amigo, por me fazer rir sempre, aturar minhas chatices e indecisões e por me fazer tão feliz. “Só tinha que ser com você...”

À Creusiná, pela amizade e por estar sempre disposta a ajudar quando preciso.

Aos meus orientadores Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto e Dr<sup>a</sup> Adriana Ribeiro Silva, pelo total apoio, por acreditarem em mim e por sempre contribuírem com suas experiências acadêmicas.

Às minhas amigas da faculdade Larissa, Thaís, Nívia e Suzana. Sei que mesmo estando longe torcem por mim.

À amiga Rosana, minha afilhada, pela grande amizade.

Às amigas do MV1, pelas amizades maravilhosas e confiança.

A Dr<sup>a</sup> Patrícia Bozza, pelo apoio e confiança.

Ao Dr. Fernando Bozza, pelo apoio, confiança e disposição em ajudar sempre.

Ao Dr. Valber, pelo carinho e apoio.

Ao meu co-orientador Dr. Cassiano Felipe, por me introduzir ao laboratório, acreditar no meu potencial e pelo apoio.

À Clarissa Campbell, mais que uma amiga, quase uma terapeuta, pelos bons conselhos.

À Isabel, grande amiga, parceira de experimentos, meu braço-direito no lab, que foi imprescindível para a realização deste trabalho. Uma das melhores companhias que poderia ter durante mais uma etapa. Por me ajudar sempre e pela organização!

À Cláudia Valéria, exemplo de didática, pela grande amizade.

À Isacláudia, pela prestatividade e boas conversas.

Ao André Costa, pela amizade e carinho.

Ao Edson Assis, pela prestatividade, ótimas conversas e boas risadas. Amizade que espero ter por toda a minha vida.

À Rachel, amiga, um pouco mãe, pelo carinho, pelos conselhos, por me ouvir e por acreditar em mim sempre. E por me colocar pra cima nos momentos difíceis. Sem você, acho que meu emocional entraria em colapso! E por iluminar o nosso ambiente de trabalho com sua alegria!

À Nathalia Roque, por todo o apoio e pela ótima companhia.

À Dra. Patrícia Reis, pela ajuda essencial e otimismo.

À Mary pela ajuda nos experimentos, pelas conversas, companhia pra sair onze horas do laboratório.

À Rose Branco, pelo carinho, total eficiência e pela prestatividade com todos no laboratório. Sem ela o laboratório certamente não seria o mesmo.

A todos do laboratório de Imunofarmacologia. Um laboratório repleto de grandes pesquisadores que também me ajudaram durante este trabalho.

Aos amigos da CCDD e cia, pelas gargalhadas, invenções de gírias e ótimos momentos de descontração.

À Luiza Resende de Faria, amiga, pelos momentos de descontração.

A todos do Pavilhão Ozório de Almeida, pelo suporte necessário ao nosso trabalho.

Às agências de fomento e ao CECAL.

Aos meus amigos e todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

# ÍNDICE

Resumo	x
Abstract	xi
Lista de Tabelas e Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1 Sepses	1
1.1.1 Definição	1
1.1.2 Aspectos Epidemiológicos	3
1.1.3 Aspectos Fisiopatológicos	6
1.1.4 Resposta Imune Inata	9
1.1.4.1 Receptores de Reconhecimento de Padrões	9
1.1.4.2 Mediadores Lipídicos	13
1.1.4.3 Mediadores Solúveis	15
1.1.4.4 Espécies Reativas – Óxido nítrico na sepsis	18
1.1.5 Modelos Animais de Sepsis	20
1.2 Estatinas	21
1.2.1 Utilização das estatinas em estudos clínicos	23
1.2.2 Uso das estatinas em modelos animais	24
2. Objetivos	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. Material e Métodos	26
3.1 Animais	26

3.2 Drogas e soluções.....	26
3.2.1 Preparo da sinvastatina para experimentos <i>in vivo</i> .....	26
3.2.2 Preparo da sinvastatina para experimentos <i>in vitro</i> .....	26
3.2.3 Preparo e Imipenem.....	27
3.2.4 Preparo de solução salina tamponada por fosfato (PBS) pH=7,4.....	27
3.2.5 Líquido de Turk.....	27
3.2.6 TSA – Tryptic Soy Agar.....	28
3.2.7 Soluções para ELISA.....	28
3.3 Indução de sepse polimicrobiana pelo modelo de Ligadura e Perfuração Cecal (CLP) em camundongos SW.....	29
3.4 Avaliação de carga bacteriana e parâmetros celulares.....	29
3.5 Análise Bioquímica.....	30

## RESUMO

A sepse é uma condição médica severa, caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica (designada por Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica), que ocorre em vigência de um quadro infeccioso, podendo evoluir para disfunção múltipla dos órgãos e morte. Atualmente é a principal causa de morte nas Unidades de Terapia Intensiva em todo o mundo. Nos últimos anos, diversos medicamentos foram testados na prevenção e tratamento da sepse, com resultados pouco animadores. Estudos recentes mostraram que as estatinas (drogas hipolipemiantes amplamente utilizadas no tratamento de dislipidemias) foram capazes de reduzir a mortalidade em pacientes sépticos, bem como o risco do desenvolvimento de sepse severa. As estatinas atuam inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa a conversão da HMG-CoA em mevalonato, etapa limitante na biosíntese do colesterol. Além de agirem na diminuição do colesterol sérico, as estatinas estão emergindo como potentes inibidores de processos inflamatórios, ações conhecidas como efeitos pleiotrópicos. Neste estudo tivemos como principal objetivo a avaliação dos efeitos da sinvastatina em um modelo de ligadura e punção cecal (CLP), especificamente sobre a taxa de sobrevivência e parâmetros inflamatórios, como migração celular, ativação celular, eliminação bacteriana e produção de óxido nítrico. Observamos que a sinvastatina foi capaz de causar uma tendência de melhora nas funções renais e hepáticas de animais submetidos ao CLP. Observamos também que 24 horas após a cirurgia houve aumento da migração celular para o peritônio, ocorrendo uma tendência de reversão deste efeito após o tratamento com sinvastatina (2 mg/kg). Nossos resultados também mostraram que a sinvastatina foi capaz de reduzir os níveis de TNF- $\alpha$ , MIF, IL-6 e IL1 $\beta$ . Nossos resultados mostraram um aumento significativo na produção de óxido nítrico no peritônio de animais que receberam o tratamento com sinvastatina, o que pode estar relacionado com o resultado obtido na contagem de Unidades Formadoras de Colônias, da qual houve uma tendência de diminuição. O tratamento com sinvastatina ainda mostrou poder ser capaz de diminuir a produção de óxido nítrico na corrente sanguínea. Observamos, também, alteração na formação de corpúsculos lipídicos de células provenientes do lavado peritoneal de camundongos tratados com a droga, sendo este número menor nesses animais. E ainda, foi observado um efeito *in vitro* da droga sobre macrófagos peritoneais, havendo diminuição do CFU em todas as concentrações utilizadas. Nossos estudos, portanto, indicam que os efeitos da sinvastatina estão relacionados a determinantes da fisiopatologia da sepse, o que torna de grande importância a contínua avaliação de seus mecanismos de ação, para que possivelmente esta droga seja implementada como terapia adjuvante no tratamento da sepse.

## ABSTRACT

Sepsis is a severe medical condition characterized by a systemic inflammatory response (called systemic inflammatory response syndrome), which occurs in the presence of an infection, may progress to multiple organ dysfunction and death. It is currently the leading cause of death in intensive care units worldwide. In recent years, several drugs were tested in the prevention and treatment of sepsis, without good results. Recent studies have shown that statins (lipid-lowering drugs widely used to treat dyslipidemia) were able to reduce mortality in septic patients, as well as the risk of developing severe sepsis. Statins act by inhibiting 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, an enzyme that catalyzes the conversion of HMG-CoA to mevalonate, the limiting step in cholesterol biosynthesis. In addition to acting in the reduction of serum cholesterol, statins are emerging as potent inhibitors of inflammatory processes, actions known as pleiotropic effects. This study had as main objective the evaluation of the effects of simvastatin in a model of cecal ligation and puncture (CLP), specifically on the rate of survival and inflammatory parameters, such as cell migration, cell activation, bacterial elimination and production of nitric oxide. We found that simvastatin was able to cause a trend toward improvement in kidney function and liver of animals subjected to CLP. We also note that 24 hours after surgery there was an increase of cell migration to the peritoneum, causing a trend reversal of this effect after treatment with simvastatin (2mg/kg). And also our results showed that simvastatin was able to reduce the levels of TNF- $\alpha$ , MIF, IL-6 and IL1 $\beta$ . Our results showed a significant increase in the production of nitric oxide in the peritoneum of animals that received treatment with simvastatin, which may be related to the result obtained in the counting of colony forming units, of which was diminished. Treatment with simvastatin also showed to be able to decrease the production of nitric oxide in the bloodstream. We also observe changes in the formation of lipid bodies from the peritoneal cavity of mice treated with the drug, this number is lower in these animals. And yet, there was a drug effect in vitro on peritoneal macrophages, with the CFU decrease at all concentrations used. Our studies thus indicate that the effects of simvastatin are related to determinants of the pathophysiology of sepsis, which makes it of great importance to continuing evaluation of its mechanisms of action, possibly to be implemented as adjunctive therapy in the treatment of sepsis.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1.1 Incidência e mortalidade na sepse, sepse grave e choque séptico.....	4
Figura 1.2 Principais fontes de infecção na sepse.....	5
Figura 1.3 Principais microorganismos identificados na sepse.....	5
Figura 1.4 Fisiopatologia da sepse e falência de múltiplos órgãos.....	7
Figura 1.5 Curso da sepse.....	9
Tabela 1.1 Localização de TLRs e seus respectivos PAMPs.....	11
Figura 1.6 Receptores da família toll (TLR) e suas vias de sinalização.....	12
Figura 1.7 Receptores de superfície que reconhecem LPS.....	13
Tabela 1.2 Principais citocinas relacionadas à resposta imune inata e suas funções.....	15
Figura 4.1 Efeito da sinvastatina na função renal e hepática de animais submetidos ao CLP.....	33
Figura 4.2 Análise da celularidade de amostras do lavado peritoneal de camundongos SW submetidos ao CLP e tratados com sinvastatina.....	35
Figura 4.3 Efeito da sinvastatina na formação de corpúsculos lipídicos em células do lavado peritoneal de animais submetidos ao CLP.....	36
Figura 4.4 Efeito do tratamento com sinvastatina nos níveis de mediadores solúveis provenientes do sobrenadante do lavado peritoneal de animais submetidos ao CLP.....	38
Figura 4.5 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a eliminação bacteriana em animais submetidos ao CLP.....	39
Figura 4.6 Efeito da sinvastatina na produção de óxido nítrico no plasma e peritônio de camundongos SW sépticos.....	40
Figura 4.7 A sinvastatina favorece uma melhor eliminação de bactérias por macrófagos peritoneais estimulados com <i>E. coli</i> .....	41
Figura 4.8 Efeito do tratamento com sinvastatina na mortalidade de animais submetidos ao CLP.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

A.C. – Antes de cristo

BSA – albumina bovina sérica (*bovie serum albumin*)

CARS – Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (*Compensatory Antiinflammatory Syndrome*)

CD – grupo de diferenciação (*cluster differentiation*)

CECAL – Centro de criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz

CFU – Unidade Formadora de Colônia (*Colony Forming Unit*)

CLP – Ligadura e perfuração cecal

COX – Ciclooxigenase

DMSO – Dimetilsulfóxido

DO – Densidade ótica

*E.coli* – *Escherichia coli*

ELISA – Análise de imuno-absorção por ligação enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

GSA – *Global Sepsis Alliance*

GTP – Guanosina trifosfato

HMG-CoA – 3-hydroxi-3methyl-glutaryl coenzima A

ICAM – Molécula de adesão intercelular

IFN- $\gamma$  – Interferon gama

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida (*Inducible nitric oxide sintase*)

i.p. – intraperitoneal

KC – homóloga murina da quimiocina IL-8 humana

LPS – Lipopolissacarideo

LFA – Antígeno associado à função do linfócito

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

Meio LB – meio Luria-Bertani broth (*Luria Broth Miller*)

MIF – Fator de inibidor da migração de macrófagos

Mrsa – *Staphylococcos aureus metilino resistente*

NF- $\kappa$ B – Fator nuclear kappa-B

NO – óxido nítrico

PAF – fator de ativação plaquetária

*P.aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

PAMP – Padrão molecular associado a patogeno

PAI-1 – Inibidor de ativação do plasminogênio - 1  
PBS – Solução de fosfato tamponada  
PGE2 – Prostaglandina E2  
PPAR – Receptor ativado por proliferadores de peroxissomo  
PRR – Receptor de reconhecimento de padrões  
ROS – Espécie reativa de oxigênio  
RPMI – Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute  
*S.aureus* – *Staphylococcos aureus*  
SDMO – Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos  
SFB – Soro fetal bovino  
SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica  
TF – Fator tecidual  
Th – T auxiliar  
TLR – Receptores semelhantes ao Toll (*Toll like receptors*)  
TNF – Fator de necrose tumoral  
TNFR – Receptor de fator de necrose tumoral  
TSA – Agar de soja triptica  
UTI – Unidade de Terapia Intensiva  
VCAM – Molécula de adesão vascular

## 1. Introdução

### 1.1 Sepses

#### 1.1.1 Histórico e definição

O termo Sepses está intimamente relacionado à terapia intensiva moderna, porém seu conceito médico é particularmente antigo. A palavra sepses deriva do grego antigo *sepo* (“putrefação”) e foi primeiramente introduzido por Hipócrates (460-370 AC), que a utilizava para descrever processos relacionados às manifestações clínicas da doença (Geroulanos e Douka, 2006). Ibn Sina observou a associação entre a putrefação do sangue com a febre. Esse conceito perdurou até o século XIX, quando trabalhos de Semmelweis, Pasteur e Lister, estabeleceram definitivamente a relação entre micróbios e infecções supurativas, e ainda, Sir William Osler, pela primeira vez reconheceu “que, exceto em algumas ocasiões, o paciente parece falecer da resposta do organismo à infecção e não da infecção *per se*” (Osler, 1921). Em 1914, Hugo Schottmüller escreve: “Septicemia é um estado de invasão microbiana através de uma porta de entrada para a corrente sanguínea que causa sinais de doença”, lançando a base para a definição moderna da sepses. Posteriormente Lewis Thomas descreveu: “é a nossa resposta ao microorganismo que causa a doença (sepses) e o nosso arsenal contra a bactéria é tão forte, que pode ser mais perigoso do que a própria bactéria” (Thomas, 1972). De fato, um dicionário médico de 1972 define sepses como: “... presença de micro-organismos formadores de pus na corrente sanguínea...” (Wilkins, 1972).

A partir desse conceito, novos estudos foram realizados voltados para a análise da resposta do hospedeiro à infecção. Em meados dos anos 60, diversos trabalhos apontaram a disfunção orgânica como uma complicação da sepses severa. Diferentes termos surgiram na tentativa de descrever esta síndrome clínica que envolve também a falência de sistemas de órgãos independentes (Bone et al., 2009). A grande quantidade de termos sinônimos para designar a mesma condição clínica e seus diferentes níveis de gravidade, provocando desigualdade de condutas e comparação entre trabalhos levou à realização de uma conferência consenso pelo *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine*, em agosto de 1991, onde foram uniformizadas as seguintes definições (Bone et al., 1992a):

- ✓ **Infecção:** fenômeno microbiano, caracterizado por uma resposta inflamatória à presença de micro-organismos ou à invasão de tecidos normalmente estéreis por estes organismos;
- ✓ **Bacteremia:** presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea;
- ✓ **Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS):** é uma resposta inflamatória a uma grande variedade de condições clínicas severas. Essa resposta é manifestada por duas ou mais das seguintes condições: 1) temperatura > 38 °C ou < 36 °C; 2) frequência cardíaca > 90 bpm; 3) frequência respiratória > 20 ipm ou pCO<sub>2</sub> < 32 mmHg; 4) contagem de glóbulos brancos > 12.000/ mm<sup>3</sup> ou < 4.000/ mm<sup>3</sup> ou bastonetes > 10%;
- ✓ **Sepse:** resposta inflamatória à infecção, manifestada por duas ou mais das seguintes condições: 1) temperatura > 38 °C ou < 36 °C; 2) frequência cardíaca > 90 bpm; 3) frequência respiratória > 20 ipm ou pCO<sub>2</sub> < 32 mmHg; 4) contagem de glóbulos brancos > 12.000/ mm<sup>3</sup> ou < 4.000/mm<sup>3</sup> ou bastonetes > 10%;
- ✓ **Sepse grave (severa):** sepse associada com disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão. Hipotensão e anormalidades da perfusão podem incluir, mas não são limitadas por acidose láctica, oligúria ou uma alteração aguda no estado mental;
- ✓ **Hipotensão relacionada à sepse:** pressão arterial sistólica < 90 mmHg ou uma redução > 40 mmHg da linha de base, na ausência de outras causas de hipotensão;
- ✓ **Choque séptico:** sepse relacionada com hipotensão, apesar da adequada reposição volêmica com a presença de anormalidades da perfusão que podem estar associadas à acidose metabólica, oligúria ou alteração aguda do estado mental. Pacientes que recebem agentes inotrópicos ou vasopressores podem não estar hipotensos no momento em que as anormalidades da perfusão são medidas;
- ✓ **Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO):** presença da alteração na função orgânica, em um paciente agudamente enfermo, de modo que a homeostasia não possa ser mantida sem suporte avançado de vida.

A sepse, então, foi definida como a resposta inflamatória sistêmica associada a um processo infeccioso, envolvendo diversos micro-organismos como bactérias, fungos, vírus e parasitas (Bone et al., 1992b).

Em 2010, a GSA (*Global Sepsis Alliance*) promoveu o Simpósio Merinoff, onde participantes da conferência ratificaram uma nova definição para a doença: “Sepse é uma condição ameaçadora da vida que evolui quando a resposta do

hospedeiro à infecção prejudica seus próprios tecidos e órgãos. Sepsis pode levar ao choque, falência de múltiplos órgãos e morte, especialmente se não diagnosticada e tratada prontamente”.

### **1.1.2 Aspectos epidemiológicos**

A sepsis é caracterizada por um conjunto de alterações clínicas sistêmicas causadas pelo desequilíbrio na resposta imune do paciente frente à presença de um microorganismo ou partes dele na corrente sanguínea (Brun-Buisson, 2000). Apesar do desenvolvimento tecnológico e avanços observados nos últimos anos na Medicina Intensiva, a incidência de sepsis vêm aumentando nos últimos anos e a mortalidade apresentou apenas discreta redução (Angus e cols., 2001; Angus e Wax, 2001; Annane e cols., 2003; Vincent e cols., 2002a; Vincent e cols., 2002b).

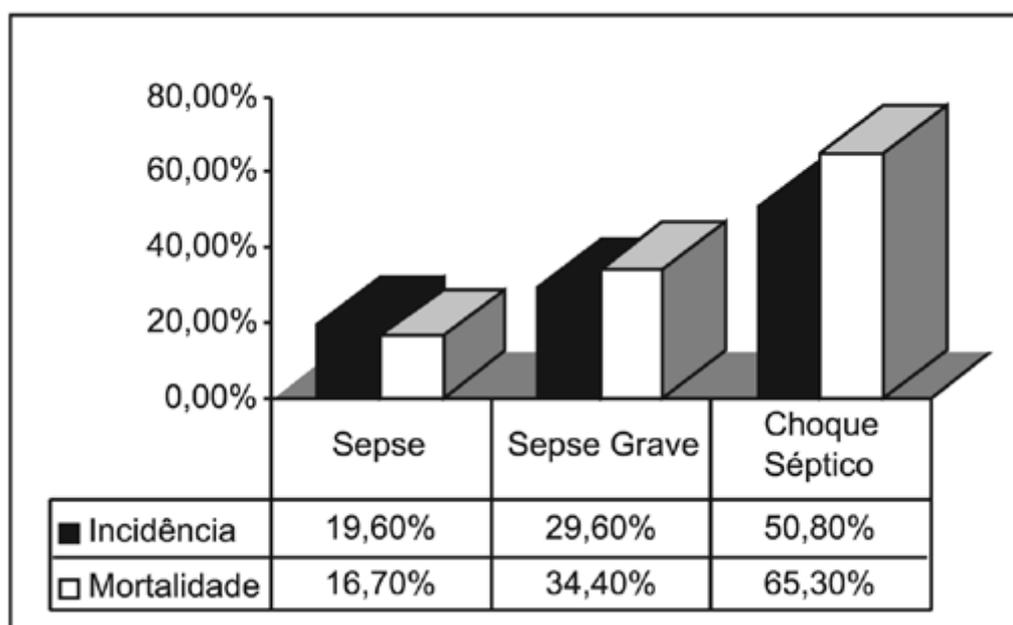
A sepsis é a 10ª causa de morte mais comum no mundo, superando as taxas de mortalidade combinadas das neoplasias de mama, colorretal, pâncreas e próstata, sendo dominante em número de casos em unidades de tratamento intensivo não-coronarianas (Angus e cols., 2006). Estudos estimam que mais de 750.000 indivíduos (300 casos por 100.000 habitantes) desenvolvam sepsis severa por ano nos Estados Unidos, com morte de aproximadamente 215.000 pacientes (Angus e Wax, 2001). Sepsis severa é desenvolvida quando a doença ocorre em combinação com sequelas em um ou mais órgãos, levando ao choque séptico e falência de múltiplos órgãos (Balk, 2000).

Apesar de qualquer indivíduo, desde crianças a adultos, apresentarem chances de desenvolver sepsis a partir de pequenas infecções (infecções do trato urinário, gastroenterites, entre outros), pacientes com o sistema imune comprometido, neonatos e idosos representam uma população de risco. E ainda, pacientes que são admitidos ao hospital com infecções graves estão em maior risco de desenvolver sepsis (Brun-Buisson, 2000).

O custo financeiro anual da sepsis, calculado nos Estados Unidos em 1995, foi de 16,7 bilhões de dólares, sendo estimado o gasto, com cada paciente, de 50.000 dólares (Angus e cols., 2001). A alta incidência reflete nos gastos com a internação dos pacientes. Dentre os pacientes com maiores custos estão: infantes, pacientes de unidade de terapia intensiva e pacientes com falência de órgãos (Angus e Wax, 2001).

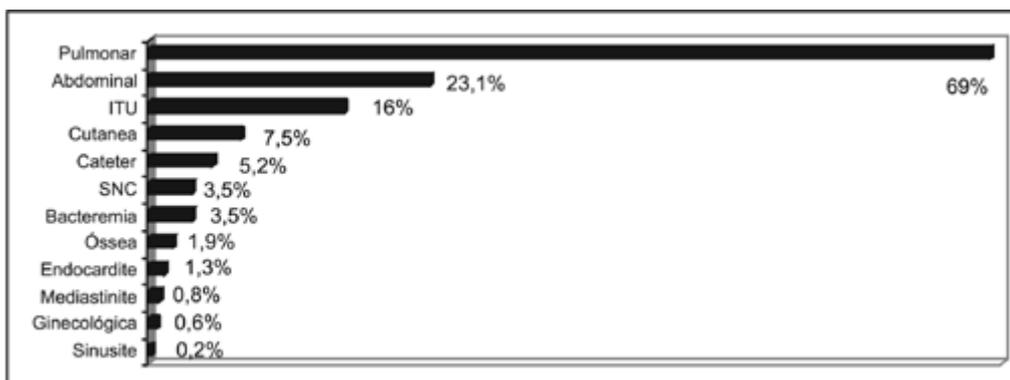
Os dados epidemiológicos sobre a presença de sepsis nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) brasileiras ainda são escassos. O Sepsis Brasil, um estudo

envolvendo 3128 pacientes internados em 75 UTIs de diferentes regiões do Brasil, mostrou que a incidência de sepse foi de 19% e a taxa de mortalidade entre esses pacientes foi de aproximadamente 16%. A mortalidade aumentou de acordo com a severidade da doença, uma vez que pacientes com sepse grave e choque séptico apresentaram taxa de mortalidade de 34,4% e 65,3%, respectivamente (Figura 1.1) (Silva e cols., 2004).



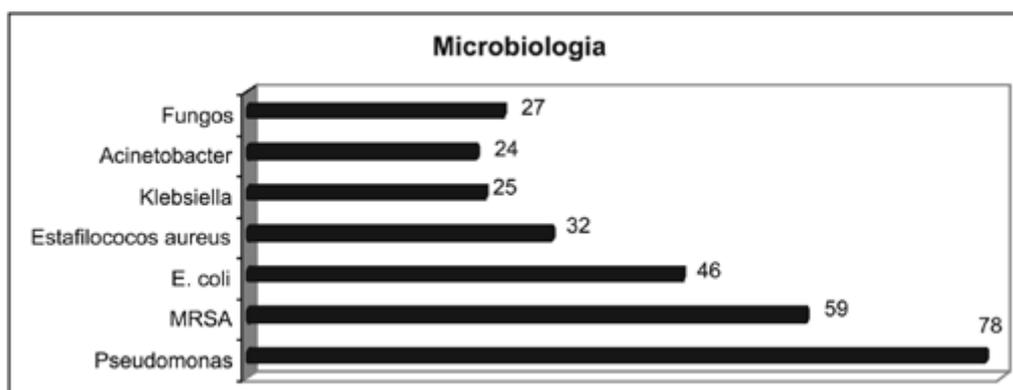
**Figura 1.1** - Incidência e mortalidade na sepse, sepse grave e choque séptico (Silva e cols., 2004)

Na sepse é importante a confirmação direta ou indireta de uma infecção, incluindo o sítio anatômico, o tipo de micro-organismo infectante, se a fonte de infecção é comunitária ou nosocomial e a maneira da qual foi adquirida (cirúrgica, traumática, médica). Assim sendo, 45% dos pacientes internados nas unidades de terapia intensiva apresentam infecções, sendo 21% adquiridas nessas unidades. As fontes de infecções mais freqüentes são pulmonar, abdominal, urinária, cutânea e cateteres vasculares (figuras 1.2 e 1.3). A sepse causada por infecção urinária (letalidade=30%) apresenta prognóstico melhor do que quando o sítio primário é pulmonar ou abdominal (letalidade=50% a 55%) (Silva e cols., 2004).



**Figura 1.2** - Principais fontes de infecção na sepse (Silva e cols., 2004).

Os germes frequentemente causadores de sepse são a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp e *Acinetobacter* spp figura (1.3). As bacteremias mais freqüentes são por *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Fungemias ocorrem em 5% e são mais observadas em pacientes diabéticos, em insuficiência renal e imunodeprimidos (Silva e cols., 2004).

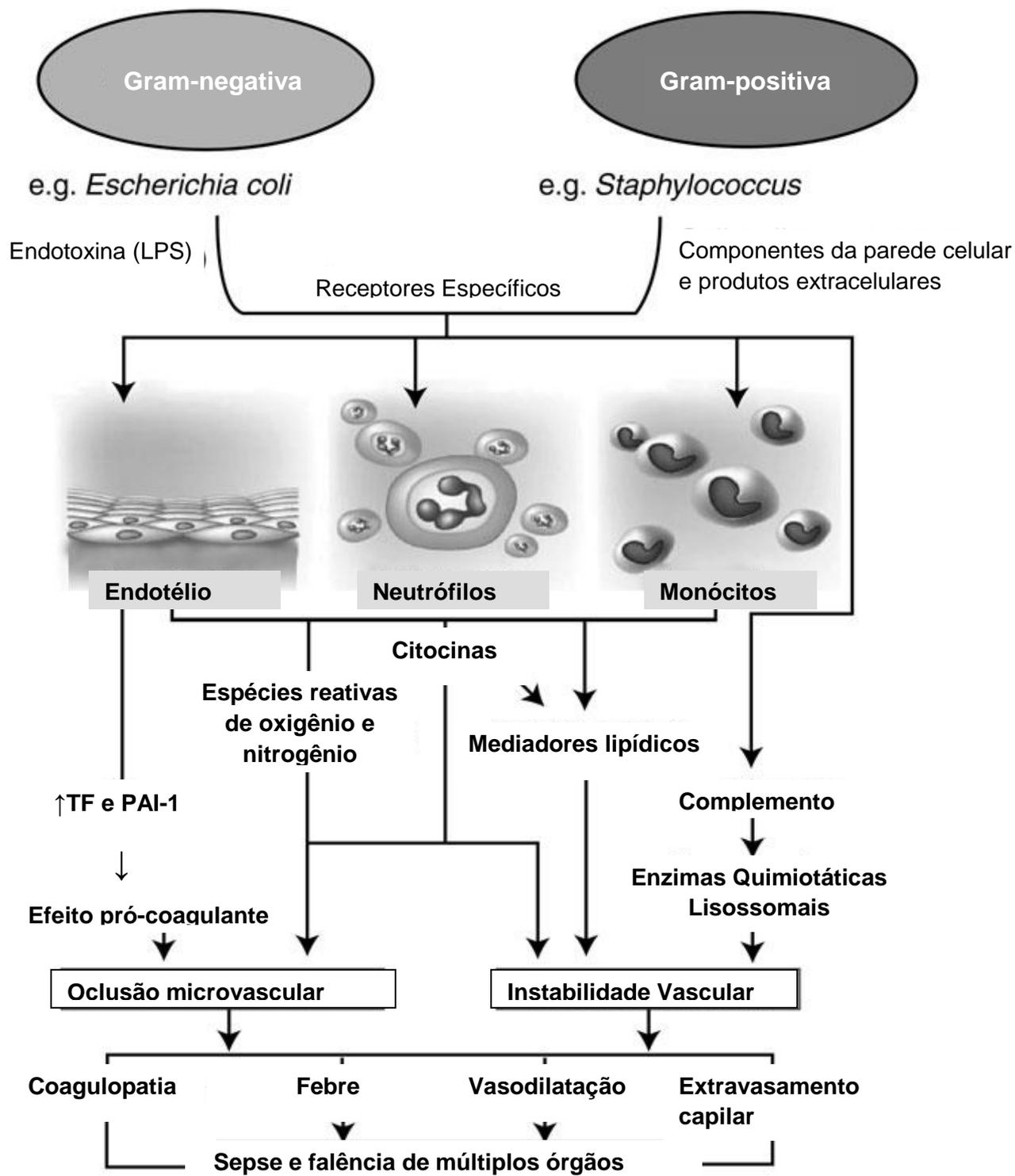


**Figura 1.3** - Principais micro-organismos identificados na sepse. Os números referem-se ao número de culturas positivas para cada patógeno. Os bacilos gram-negativos representam 40,1%, cocos gram-positivos 32,8% e fungos 5%. Mrsa; *Staphylococcus aureus* metilino resistente (Silva e cols., 2004).

A prevalência de patógenos resistentes nas UTIs está aumentando em todo o mundo. Micro-organismos resistentes associam-se à maior mortalidade (Silva e cols., 2004) e aumentam o tempo de internação. Infecções por germes multirresistentes também estão associadas à maior mortalidade.

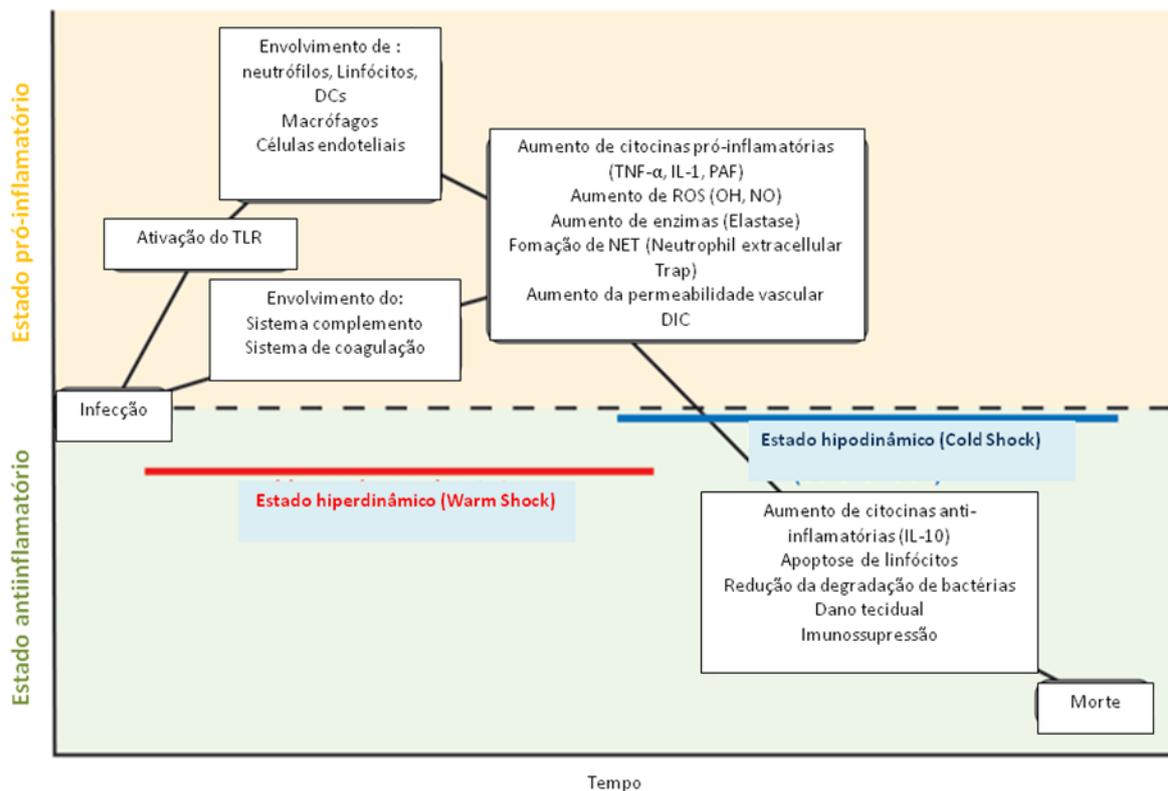
### **1.1.3 Aspectos Fisiopatológicos**

Uma resposta inflamatória eficaz elimina o microorganismo invasor sem causar danos ao organismo. A sepse é resultado de uma complexa interação entre o microorganismo infectante e a resposta imune, pró-inflamatória e pró-coagulante do hospedeiro (Russell, 2006). A resposta e as características do organismo são as principais variáveis fisiopatológicas da sepse. Dessa maneira ocorre progressão da doença quando o hospedeiro não consegue conter a infecção primária por resistência à opsonização, à fagocitose, a antibióticos e presença de superantígenos (Leaver e cols., 2007). A figura 1.4 mostra a sequência de eventos relacionados com a ativação de células do sistema imune, após interação de componentes de microorganismos com receptores de superfície, que levam à alterações imunes, inflamatórias e da coagulação na sepse (Leaver e cols., 2007). Portanto, o reconhecimento de patógenos por receptores específicos presentes em células do sistema imune, como neutrófilos e monócitos, resulta na ativação destas e do endotélio e consequente aumento da produção e liberação de mediadores da inflamação. O excesso desses mediadores causado pelo desbalanço da resposta inflamatória pode resultar em coagulopatia, febre, vasodilatação e extravasamento capilar culminando em falência de múltiplos órgãos (Cohen, 2002).



**Figura 1.4** - Fisiopatologia da sepse e falência de múltiplos órgãos, adaptado de (Cohen, 2002).

O quadro de sepse é caracterizado por uma síndrome de resposta inflamatória severa (SIRS, do inglês *Severe Inflammatory Response Syndrome*), definida como uma reação inflamatória generalizada em resposta a traumas, queimaduras ou infecções (Brun-Buisson, 2000). Na fase inicial da sepse, caracterizando um estado hiperdinâmico, a resposta sistêmica à infecção é marcada por uma tempestade de citocinas, acarretando um desarranjo hemodinâmico e metabólico que pode resultar em choque séptico, falência de múltiplos órgãos (MOD, do inglês *Multiple Organ Dysfunction*) e morte (Guyton e cols., 2003). Após a resposta pró-inflamatória inicial, com alteração para um estado hipodinâmico, segue-se um período de ausência de resposta imune chamado síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS, do inglês *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrom*) (Hotchkiss e Karl, 2003) (Figura 1.5). Essa síndrome parece causar alterações epigenéticas duradouras que levam o paciente a um estado de imunossupressão prolongado (Carson e cols, 2011), reduzindo em até 8 anos sua expectativa de vida (Quartin e cols., 1997) em função de uma susceptibilidade maior a infecções causadas por patógenos classicamente descritos como nosocomiais ou oportunistas, como *Aspergillus fumigatus* e *P. aeruginosa* (Benjamim e cols., 2003; Pene e cols., 2008).



**Figura 1.5** - Curso da sepse. A sepse possui duas fases, um estado pró-inflamatório e outro anti-inflamatório. Adaptado de (Doi e cols., 2009).

### 1.1.3 Resposta Imune Inata

#### 1.1.3.1 Receptores de Reconhecimento de Padrões

O sistema imune inato compreende uma subdivisão do sistema imune que representa a primeira linha de defesa do organismo contra agentes patogênicos, visando impedir a infecção do hospedeiro. Os principais componentes desse sistema são as barreiras físicas e químicas, tais como epitélio e enzimas intestinais, células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células NK (Natural Killer) e células dendríticas, proteínas do sangue e os mediadores solúveis, que coordenam e regulam atividades de células da imunidade inata e adquirida (Akira e cols., 2006). O sistema imune inato atua através do reconhecimento de estruturas características de patógenos microbianos, denominadas padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated Molecular Pattern*). Dentre os PAMPs podemos destacar o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas, os peptidoglicanos, lipoarabinomanano de micobactéria (LAM), zimozan (levedura), flagelina, DNA bacteriano e RNA viral (Cohen, 2002).

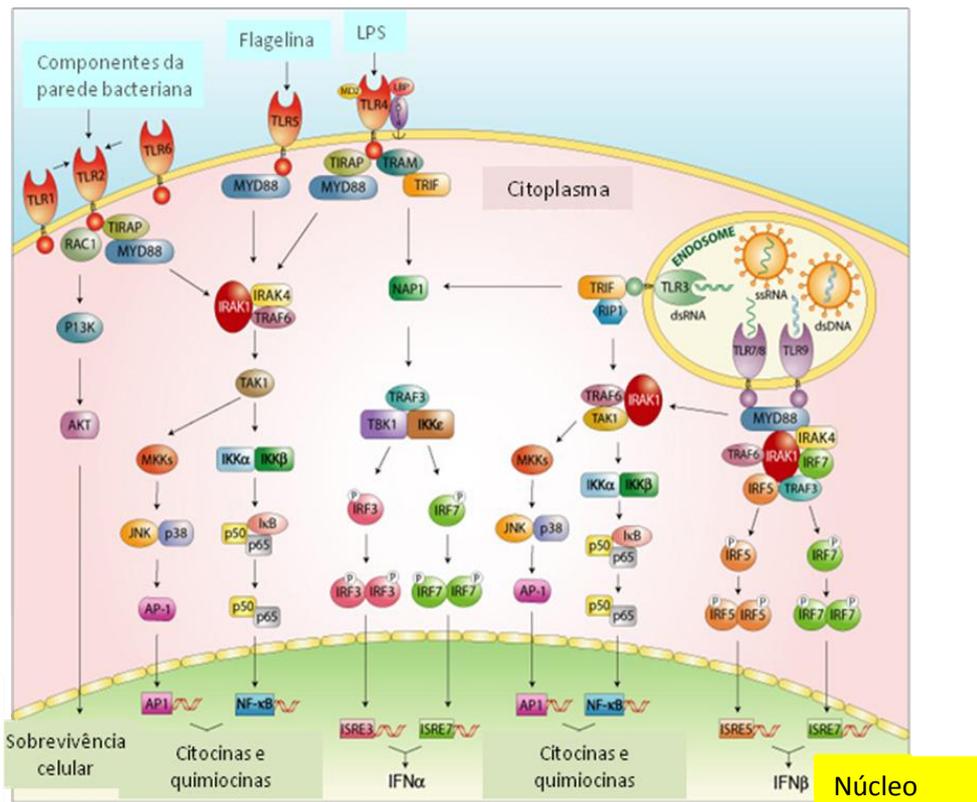
Os componentes celulares do sistema imune inato possuem proteínas específicas encontradas em suas superfícies que são as responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs. Estas proteínas são chamadas de receptores de reconhecimento de padrão (PRR, do inglês *Pattern Recognition Receptor*) e estão associadas a vias de transdução de sinal intracelulares (Akira e cols., 2006). Portanto, a ligação de PAMPs aos PRR leva a ativação celular, promovendo o acionamento da cascata de sinalizações intracelulares que culminam com a fagocitose do patógeno, bem como a produção e liberação de moléculas promotoras da inflamação e defensoras contra micróbios (Akira e Takeda, 2004).

O grupo de PRRs melhor estudado até o momento são os receptores tipo Toll (TLR, do inglês *Toll Like Receptors*) descritos em *Drosophila* (Medzhitov e cols., 1997). Estima-se que os mamíferos possuam cerca de 10 a 15 tipos de receptores toll-like (Figura 1.7). Os diferentes tipos de TLR localizam-se tanto na membrana plasmática das células imunes como na membrana endossômica e reconhecem produtos microbianos distintos. Um resumo dos tipos e localização de TLRs e os PAMPs reconhecidos por eles pode ser encontrado na tabela 1.1.

Tabela 1.1 Tipos de Receptores Toll, sua localização celular e respectivos PAMPs		
Tipos de TLRs	Localização Celular	PAMPs
TLR1	Membrana Plasmática	Lipopeptídeos triacilados bacterianos
TLR2	Membrana Plasmática	Peptidoglicano; lipoproteína; ácido lipoteicóico e porinas bacterianos; hemaglutinina viral; lipopeptídeos diacilados e triacilados
TLR3	Membrana Endossômica	RNA bifilamentar viral
TLR4	Membrana Plasmática	LPS bacteriano gram-negativo; mananos fúngicos; fosfolipídeos parasitários; proteínas de invólucro viral; proteínas de choque térmico dos hospedeiro
TLR5	Membrana Plasmática	Flagelina Bacteriana
TLR6	Membrana Plasmática	Lipopeptídeos diacilados e ácido lipoteicóico bacterianos
TLR7	Membrana Endossômica	RNA monofilamentar viral
TLR8	Membrana Endossômica	RNA monofilamentar viral
TLR9	Membrana Endossômica	Cpg DNA não-metilado viral e bacteriano
TLR10	Não descrito	Não descrito

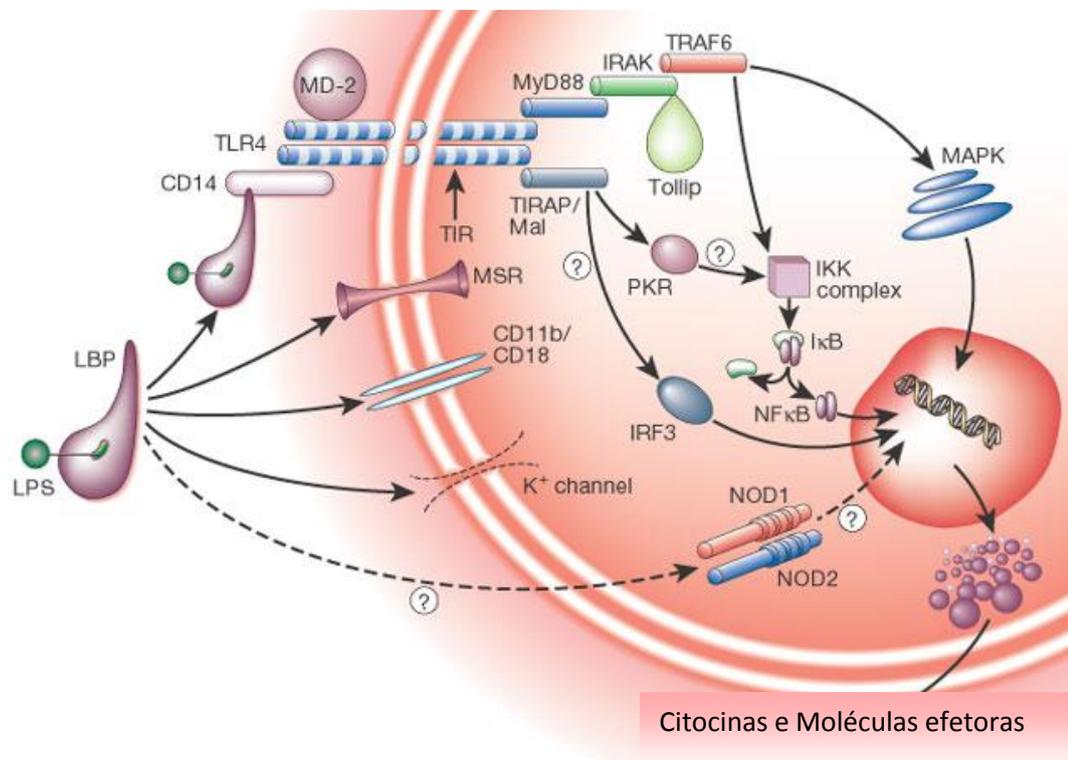
*Tabela 1.1: Localização de TLRs e os seus respectivos PAMPs.*

As especificidades dos TLRs também são influenciadas por várias moléculas acessórias não-TLR. Tal fato é mais completamente compreendido em relação a TLR4 e seu ligante LPS, onde as proteínas extracelulares CD14 e MD2 são requeridas para a sinalização eficiente induzida pelo LPS. A sinalização pelo TLR exige dimerização das proteínas TLR na membrana celular (Broad e cols., 2007). A partir daí a sinalização intracelular ocorre em decorrência da ligação do domínio citoplasmático do TLR, TIR (*Toll-IL-1 receptor homology domain*), ao IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*), processo facilitado por duas proteínas adaptadoras citoplasmáticas, MyD88 (*myeloid differentiation protein 88*) e TIRAP (*TIRdomain-containing adapter protein*) (Broad e cols., 2007). Uma vez ocorrido o processo de recrutamento de proteínas de adaptação e proteínas cinases, ocorre a ativação de fatores de transcrição de genes, como por exemplo, o NFκB, levando ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão endotelial, moléculas co-estimuladoras e citocinas antivirais (figura 1.6) (Broad e cols., 2007).



**Figura 1.6-** Receptores da família toll (TLR) e suas vias de sinalização (West e cols., 2006)

Além dos receptores do tipo Toll, outras moléculas de superfície também são capazes de reconhecer o LPS, como receptores de varredura de macrófagos (MRS, do inglês *Macrophage Scavenger Receptor*), CD11b/CD18 e canais iônicos, como representado na figura 1.8.



**Figura 1.7** – Receptores de superfície que reconhecem LPS. Adaptado de (Cohen, 2002).

### 1.1.3.2 Mediadores Lipídicos

Os mediadores lipídicos são mensageiros químicos liberados localmente em resposta a um estímulo extracelular. Eles representam uma classe de lipídios bioativos que ao serem liberados para fora da célula, se ligam a receptores acoplados a proteína G (GPCRs) para transmitir sinais às células alvo (Murakami, 2011). Os mediadores lipídicos melhor descritos até o momento incluem os eicosanóides derivados do ácido araquidônico (AA), que compreendem as prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) e os lisofosfolípidios e seu relativos, como o fator ativador de plaquetas (PAF). E mais recentemente foram identificados os mediadores antiinflamatórios derivados de ácidos graxos poliinsaturados  $\omega$ -3 (PUFAs), como resolvinas e protectinas (Murakami, 2011).

A primeira classe de mediadores lipídicos a ser identificada foram os eicosanóides. Os eicosanóides são produzidos a partir da oxigenação do AA através

da atuação das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) e controlam processos celulares importantes, como ativação celular, metabolismo, migração e morte (Murakami, 2011). A compartimentalização das enzimas que participam da produção de eicosanóides varia de acordo com o tipo celular e de estímulos e são conhecidos diferentes sítios de localização intracelular dessas enzimas, dentre eles os corpúsculos lipídicos (Bozza e cols., 2005).

Os corpúsculos lipídicos são organelas esféricas de eletro densidade variável envoltas por uma monocamada composta por fosfatidilcolina e ácidos graxos insaturados (Tauchi-Sato e cols., 2002). Seu conteúdo é constituído basicamente por triacilglicerol, diacilglicerol, colesterol livre e ésteres de colesterol, além de apresentar uma composição protéica variável (Brown, 2001; Murphy, 2001; Zweytick e cols., 2000).

Uma consequência do reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos, como o LPS, é a ativação celular, com aumento da formação desses corpúsculos lipídicos (Pacheco e cols., 2002). Diversos estímulos diretamente relacionados a micro-organismos ou liberados durante a resposta inflamatória foram descritos como capazes de modular a biogênese de corpúsculos lipídicos (Bozza et al., 2009). Enquanto alguns tipos celulares (como hepatócitos e adipócitos) apresentam corpúsculos em abundância, outras células (como leucócitos) apresentam baixos níveis basais de corpúsculos, que podem ser regulados em número, tamanho e conteúdo frente a uma variedade de estímulos (Murphy, 2001). Sendo assim, os corpúsculos se destacam como sítios intracelulares dinâmicos cuja gênese não se deve a um mero acúmulo de ácidos graxos, mas sim a um processo altamente regulado e que depende do estímulo e tipo celular (Bozza e Bandeira-Melo, 2005).

Já foi observado que os corpúsculos lipídicos de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos constituem sítios intracelulares de araquidonato esterificado tanto em lipídios neutros quanto em diferentes classes de fosfolipídios (Bozza e cols., 2007; Johnson e cols., 1999; Weller e cols., 1989; Weller e cols., 1991; Yu e cols., 1998). Essas organelas existem em baixo número como constituintes normais dos leucócitos, incluindo eosinófilos, neutrófilos e monócitos/macrófagos (Weller e cols., 1999). Assim, pode-se afirmar que os corpúsculos lipídicos possuem um papel fundamental na elevada capacidade que os leucócitos têm de gerar eicosanóides em condições inflamatórias (Bozza e cols., 2005).

### 1.1.3.3 Mediadores Solúveis

Os mediadores solúveis são variados e derivam de precursores plasmáticos e celulares, sendo produzidos a partir da ativação de genes relacionados à resposta inflamatória em células da imunidade inata. As células mononucleares desempenham um papel importante neste processo, pois são as principais produtoras de moléculas tanto pró-inflamatórias quanto antiinflamatórias. A tabela 1.2 mostra as principais citocinas envolvidas na resposta imune inata e suas funções.

Citocina	Células produtoras	Alvos e efeitos	Implicação terapêutica
<b>Citocinas relacionadas à resposta imune inata</b>			
TNF- $\alpha$	Macrófagos, células dendríticas, células endoteliais	Vasculatura (inflamação); fígado (indução de proteínas de fase aguda); caquexia; morte celular; ativação de neutrófilos	Anti-TNF- $\alpha$ (Infliximab) e sTNFR:Fc (Etanercept), doenças auto-imunes (em uso)
IL-1	Monócitos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais	Vasculatura (inflamação); hipotálamo (febre); fígado (indução de proteínas de fase aguda)	IL1Ra, choque séptico (modelos experimentais); artrite reumatóide (ensaio clínico)
IL-12	Macrófagos, células dendríticas	Ativa células NK, promove a diferenciação de células Th1	IL-12, linfomas; anti-IL-12, doença de Crohn (ensaios clínicos)
IL-6*	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Fígado (induz proteínas de fase aguda), promove proliferação de células B e secreção de anticorpos, inibe diferenciação de células Treg	IL-6, câncer (ensaio clínico)
IFN- $\alpha$	Macrófagos	Induz resposta antiviral, aumenta a expressão de MHC classe I e ativa células NK	IFNrec, hepatite e câncer (em uso)
IL-23	Macrófagos	Promove a diferenciação de células Th17	Anti-IL-23, encefalomielite auto-imune (modelo experimental)

Tabela 1.2. Principais citocinas relacionadas à resposta imune inata e suas funções. Adaptado de (Goldsby RA, 2000).

Durante a sepse ocorre a liberação de diversas citocinas como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator inibidor da migração de macrófagos (MIF, do inglês *Macrophage inhibitory factor*), interleucina-12 (IL-12), interleucina-17 (IL-17), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ , do inglês *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ) e grupo de alta mobilidade do box 1 (HMGB1, do inglês *High mobility group box 1*) que é capaz de ativar a secreção de citocinas pro-inflamatórias pelo macrófago. Os mediadores anti-inflamatórios liberados durante esta síndrome são a IL-10 (interleucina 10), IL-4 (interleucina 4), antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), IL-13, entre outros. A IL-10 possui atividade supressora para macrófagos,

inibindo a síntese de mediadores pró-inflamatórios, sendo sua principal função na sepse a de suprimir a expressão e síntese de citocinas pró-inflamatórias. Já a IL-13 é capaz de inibir a produção de IL-8 (Interleucina 8) por células polimorfonucleares estimuladas com LPS (Marie e cols., 1996).

A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  induzem a síntese de outras citocinas, como IL-6 e IL-8 (Lobo e Lobo, 2007). A IL-1 $\beta$  induz ativação do endotélio vascular, ativa linfócitos, facilita o acesso de células efetoras e induz febre. A liberação de TNF $\alpha$  induz ativação do endotélio vascular e aumenta a permeabilidade dos vasos, o que ocasiona a entrada de células inflamatórias, além de produzir febre, mobilização de metabólitos e choque. A liberação de IL-6 ativa de linfócitos, aumenta a produção de anticorpos e produz febre (Janeway e cols., 2007).

O TNF- $\alpha$  é um dos mediadores responsáveis pela disfunção orgânica e aumento da letalidade durante a sepse (Gaur e Aggarwal, 2003; Gordon e cols., 2004; Leon e cols., 1998). Essa citocina é liberada principalmente por macrófagos e células endoteliais ativadas durante a infecção e possui efeitos sistêmicos (Janeway, 2007b; Old, 1985), dos quais induzir a liberação de proteínas de fase aguda por hepatócitos, promover a ativação de neutrófilos, macrófagos e células; estimular a produção de citocinas (Gaur e Aggarwal, 2003) e a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês *Intercellular adhesion molecule-1*), E-selectina e Molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1, do inglês *Vascular cell adhesion*) em células endoteliais via ativação de NF $\kappa$ B e MAPK (Mackay e cols., 1993), induzir o processo de apoptose através da sinalização do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR-1, do inglês *Tumor necrosis factor receptor-1*) (Micheau e Tschopp, 2003; Wajant e cols., 2003). Durante a fase de imunossupressão associada à sepse o TNF- $\alpha$  possui efeito protetor, uma vez que o tratamento com TNF- $\alpha$  recombinante aumenta a sobrevivência de animais submetidos ao CLP e co-infectados com *S. typhimurium* ou *Listeria monocytogenes* (Echtenacher e cols., 2003).

A IL-6 é considerada como biomarcador de severidade da sepse, onde seus níveis estão elevados em pacientes com sepse (Gogos e cols., 2000; Kox e cols., 2000). O aumento persistente de IL-6 foi associado com a disfunção orgânica múltipla (Pinsky e cols., 1993) e morte (Tanaka e cols., 1996). Essa citocina aumenta a expressão de C5a-R (Receptor do complemento C5a) no fígado, rim, coração e pulmão. O C5a por sua vez, induz a síntese de mediadores pró-inflamatórios e a liberação de espécies reativas do oxigênio, que pode levar a disfunção orgânica

(Ramnath e cols., 2008; Riedemann e cols., 2003a; Riedemann e cols., 2003b). Além disso, a IL-6 pode agir em sinergismo com o IL-1 e com o TNF- $\alpha$ , induzindo a síntese de proteínas de fase aguda (Bozza e cols., 2005; Hengst, 2003)

O MIF representa outra citocina pró-inflamatória liberada durante a sepse, e é capaz de regular positivamente a expressão de TLR-4 e a produção de TNF por macrófagos estimulados com LPS (Roger e cols., 2001a; Roger e cols., 2001b). O MIF é uma proteína pré-formada presente na glândula pituitária, em células T e em macrófagos e foi detectado aumentado no plasma de pacientes com sepse e choque séptico (Bacher e cols., 1996; Bernhagen e cols., 1993; Calandra e cols., 1994). A injeção de MIF recombinante em animais submetidos aos modelos de endotoxemia letal por LPS, aumenta a taxa de mortalidade dos animais (Bacher e cols., 1997) e a neutralização dessa citocina, aumenta a taxa de sobrevivência de animais submetidos aos modelos de endotoxemia letal (Bozza e cols., 1999), CLP e nas infecções por *E. coli* (Calandra e cols., 2000) e *P. aeruginosa* (Bozza e cols., 1999). Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que o MIF pode ser considerado um biomarcador da sepse, uma vez que a partir dos seus níveis foi possível discriminar pacientes sépticos sobreviventes e não sobreviventes (Bozza e cols., 2004).

Outro grupo de mediadores solúveis envolvidos na resposta inflamatória são as chamadas quimiocinas. As quimiocinas fazem parte de um subgrupo de citocinas e controlam a adesão, quimiotaxia e ativação de vários tipos de leucócitos. Estes mediadores atuam recrutando células inflamatórias para o local da lesão (Moser e cols., 2004). Dentre eles, podemos destacar o MCP-1/CCL2 (Proteína quimioatratora para macrófagos, do inglês *Macrophage Chemoattractant Protein*), IL-8/KC, MIP-1 $\alpha$  (Proteína inflamatória de macrófago 1, do inglês *Macrophage Inflammatory Protein 1*) e RANTES/CCL5.

A IL-8 (ou KC em murinos) promove o recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção. É produzida por macrófagos e células endoteliais e armazenada nas vesículas Weibel-palade (Janeway, 2007b; Utgaard e cols., 1998). Já o MCP-1/CCL2 e o MIP-1 $\alpha$  atraem monócitos, linfócitos, basófilos, eosinófilos e células Natural Killer (Vermont e cols., 2006). O MCP-1/CCL2 é sintetizado por células endoteliais, fibroblatos, células epiteliais, músculo liso, astrócitos, monócitos e células da micróglia, constitutivamente ou após estímulos, como o estresse oxidativo, citocinas, fatores de crescimento e durante o processo infeccioso. Essa quimiocina exerce sua atividade biológica ao se ligar ao CCR2. Existem dois tipos de

CCR2: O CCR2A, expresso por células mononucleares e células da musculatura lisa dos vasos sanguíneos e o CCR2B, expresso por monócitos e células NK - Natural killer (Deshmane e cols., 2009). Um estudo realizado por (Speyer e cols., 2004) demonstrou que células polimorfonucleares de camundongos sépticos (CLP) expressam CCR2, o que torna o MCP-1/CCL2 quimiotático também para neutrófilos. Em animais sépticos o MCP-1/CCL2 é capaz de modular a resposta inflamatória, relacionada com redução dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como KC e IL-6 (24 horas após o CLP) e de MIF (6 e 24 horas após o CLP), bem como aumento dos níveis de IL-10 (24 horas após o CLP) (Gomes e cols., 2006; Matsukawa e cols., 1999).

Além disso, estudos mostram que quimiocinas interferem no aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio em células endoteliais através da ativação de NADPH oxidase, o que pode contribuir para a progressão da sepse severa, uma vez que o NO promove a vasodilatação, aumentando o estado de hipotensão do paciente (Miyoshi e cols., 2010).

### **1.1.3.3 Espécies reativas – óxido nítrico na sepse**

Macrófagos e neutrófilos ativados durante a sepse auxiliam na destruição de patógenos fagocitados através da produção de uma variedade de moléculas tóxicas nos fagolisossomos (Underhill e Ozinsky, 2002). As células mencionadas acima convertem o oxigênio molecular em espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) das quais podemos destacar o radical hidroxila, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio e em espécies reativas de nitrogênio (RNE, do inglês *Reactive Nitrogen Species*) como o óxido nítrico (Underhill e Ozinsky, 2002). O sistema antioxidante enzimático é composto principalmente pela superóxido dismutase (SOD) e pela catalase. A SOD converte o superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto que a catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O superóxido também pode reagir com o óxido nítrico e formar o peróxido de nitrito, altamente reativo. O peróxido de nitrito pode ter efeitos tanto de oxidação quanto de nitratação. Os efeitos de oxidação irão levar a degradação do DNA, a peroxidação de lipídeos, o que altera a permeabilidade de agentes invasores, que culmina com a morte da bactéria. Entretanto, o processo de nitratação é responsável pela redução de prostaglandina sintase  $I_2$ , inibição da superóxido

dismutase (SOD), das cicloxigenases 1 e 2, e da ribonucleotídeo redutase (Korhonen e cols., 2005).

O óxido nítrico (NO) é considerado um segundo mensageiro intracelular com inúmeras funções biológicas, incluindo as funções vasodilatadora, imunológica e metabólica e é gerado por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). Duas enzimas são bem conhecidas, a isoforma constitutiva cálcio-dependente, chamada cNOS e a isoforma induzida cálcio-independente, a óxido nítrico sintase induzível, iNOS (NOS-2) (McCall e cols., 1989), expressa nos leucócitos, eritrócitos, e alguns órgãos como rim (Kan e cols., 2004; Liu e cols., 1993; Mundel e cols., 1992; Tojo e cols., 1994), fígado (Geller et al., 1993), pâncreas (Kan e cols., 2004) e pulmão (Kan e cols., 2004; Knowles e cols., 1990).

A iNOS precisa formar homodímeros para exercer sua atividade biológica, a conversão da L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico (Janeway, 2007a). Existem diversas moléculas responsáveis pelo aumento da expressão da enzima iNOS, onde podemos destacar os componentes bacterianos (DNA, LPS, ácido lipoteicóico, RNA) e citocinas, como por exemplo o IFN- $\gamma$ , o IFN- $\alpha/\beta$ , o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (Korhonen e cols., 2005).

Os dados na literatura sobre o papel do NO são controversos. Alguns autores demonstram que o NO aumenta a síntese de citocinas, o dano tecidual renal e hepático (Eum e cols., 2007; Heemskerk e cols., 2006; Hickey e cols., 2002), leva a disfunção miocárdica e a está relacionado com o aumento da mortalidade durante a sepse (Hauser e cols., 2005; Hauser e cols., 2008). De forma contrária, no modelo de infecção pulmonar crônica por *Pseudomonas aeruginosa*, o óxido nítrico tem um papel importante na prevenção do dano pulmonar, bem como na redução de mediadores pró-inflamatórios, como a IL-6 (Hopkins e cols., 2006). Esse mediador é importante também para a proteção de animais durante a sepse, onde animais geneticamente deficientes para a iNOS submetidos ao CLP possuem uma taxa de mortalidade superior aos animais que expressam a enzima (Cobb e cols., 1999). No modelo do CLP-letal, o NO reduz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal o que não é observado no CLP sub-letal (Benjamim e cols., 2000). O NO reduz a adesão de leucócitos na parede endotelial, pela modulação de CD11b/CD18 (Yang e cols., 1997).

#### 1.1.4 Modelos animais de sepse

O desenvolvimento e a progressão da sepse é multifatorial e afeta os sistemas cardiovascular, imunológico e endócrino do organismo. O estudo da sepse em humanos é dificultado por diversas razões, que incluem a complexidade da doença e a natureza heterogênea da população (Cohen e cols., 2001). Tendo em vista estas complicações, modelos animais têm sido desenvolvidos na tentativa de criar uma ferramenta valiosa para o estudo da patogênese da sepse. Estes modelos também têm desempenhado um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Bockamp e cols., 2002). O estudo da sepse em modelos animais abrange a utilização, em maiores proporções, do modelo de injeção de toxinas endógenas (LPS-endotoxemia letal), o modelo de alteração da barreira protetora endógena (CLP, CASP) e o modelo de infusão ou instilação de bactérias exógenas (Buras e cols., 2005).

No modelo de endotoxemia letal, os animais são desafiados com o lipopolissacarídeo (LPS) através de diferentes vias (intratraqueal, intraperitoneal ou intravenosa). A administração de LPS leva ao aumento de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, KC e MIP-2, onde os mesmos começam a reduzir no período de 8 horas (Remick e cols., 2000). Este perfil de liberação de citocinas e quimiocinas difere do observado em humanos, onde alcançam menores níveis e seu pico é atingido mais tardiamente (Buras e cols., 2005). Portanto, apesar das alterações na resposta fisiopatológica serem similares às observadas em pacientes, este modelo não reflete tão precisamente a sepse observada em humanos como no modelo de CLP (Remick e Ward, 2005), o que pode ocorrer devido ao processo infeccioso não ser acompanhado da replicação bacteriana, apenas mimetizando a síndrome da resposta inflamatória sistêmica ao ativar o receptor TLR-4.

Em 1980, o CLP foi desenvolvido por Wichterman e cols. (Wichterman e cols., 1980) e até hoje é considerado o principal modelo para o estudo da fisiopatologia da sepse por ser clinicamente relevante. Ele simula a ruptura do apêndice cecal ou a diverticulite perfurada. No CLP o ceco é exposto, amarrado e perfurado abaixo da válvula ileocecal, ocorrendo o extravasamento de conteúdo fecal para a cavidade abdominal, causando peritonite polimicrobiana. A severidade do CLP pode ser ajustada pelo aumento do tamanho (ajustado pela largura da agulha - gauge) ou do número de perfurações (Salgado Junior e cols., 2007) e a partir da taxa de

mortalidade o CLP pode ser classificado em letal (12 perfurações do ceco com agulha de 21 gauge) e sub-letal (2 perfurações do ceco com agulha de 21 gauge), como descrito por Benjamim e cols. (2000). O CLP sub-letal é marcado pelo aumento do número de neutrófilos na cavidade peritoneal, enquanto que no CLP-letal os neutrófilos migram menos para a cavidade, e essa redução do número de neutrófilos foi acompanhada pelo aumento da proliferação bacteriana tanto no peritônio quanto no sangue (Benjamim e cols., 2000). O modelo de CLP sub-letal (1 perfuração cecal com agulha de 18 gauge) induz inicialmente a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e MIF (Gomes e cols., 2006). Já no CLP letal podemos estudar a sepse severa marcada por resposta pró-inflamatória inicial seguida da imunossupressão, associada com a maior produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, que levam a inativação e apoptose das células de defesa (Macrófagos, neutrófilos, Células dendríticas, células T e células B), aumento do número de células T regulatórias CD4+CD25+ (Scumpia e cols., 2006) e esse conjunto de fatores predis põem a ocorrência de uma infecção secundária.

## **1.2. Estatinas**

As estatinas são uma classe de drogas amplamente utilizadas para diminuir os níveis de colesterol sérico. Sua indicação primária é a prevenção de doenças cardiovasculares (Falagas e cols., 2008). Além disso, elas têm emergido como poderosos inibidores do processo inflamatório (Greenwood e Mason, 2007). Os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores das estatinas têm sido atribuídos à inibição de produtos da via do mevalonato como os isoprenóides, farnesilfosfato e geranyl-geranylpirofosfato (Goldstein e Brown, 1990). Os últimos dois servem como lipídios de ligação a proteínas sendo adicionados após a sua tradução. Estas isoprenilações permitem a localização subcelular e o tráfego de proteínas associadas a membranas como as proteínas pequenas ligadoras de GTP (Terblanche e cols., 2007). Proteínas pequenas ligadoras de GTP desempenham importante papel na via de sinalização intracelular durante a resposta inflamatória funcionando como um modulador molecular para diversas quinases. A subfamília Ras é farnesilada e as subfamílias Rho e Rac têm o geranylgeranylfosfato ligado (Takemoto e Liao, 2001). Por conseguinte, devido à interferência com diversas vias de sinalização as estatinas alteram a disponibilidade de colesterol, a reatividade

vascular e a resposta inflamatória. E ainda, interferem nas interações intercelulares e quimiotaxia de células do sistema imune (Biasucci e cols, .).

Os efeitos atribuídos às estatinas incluem: a melhora da função endotelial e microvascular através da modulação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (Laufs e Liao, 1998); redução da atividade plaquetária (Huhle e cols., 1999); diminuição da expressão e da sinalização do TLR4 (Methe e cols., 2005); ligação direta com a integrina LFA-1, interferindo com a ligação à ICAM1 (Weitz-Schmidt e cols., 2001); diminuição da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais como P-selectina, CD11b e CD18 (Yoshida e cols., 2001); diminuição do estresse oxidativo e produção de anions superóxido no sangue *ex vivo* de pacientes com sepse (Durant e cols., 2004). Especificamente nas células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC, do inglês *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), a atorvastatina leva a uma diminuição da expressão de RNAm para IL-8, MCP-1 enquanto promove a expressão da óxido nítrico sintase (Morikawa e cols., 2002). Efeitos antimicrobianos também têm sido atribuídos às estatinas (Jerwood e Cohen, 2008). Essas drogas podem afetar a produção de substâncias produzidas durante a fase aguda da sepse, como IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , MCP-1 e proteína C reativa (Gao e cols., 2008). Muitos destes efeitos são mediados pela diminuição dos intermediários isoprenóides que, por sua vez, levam à inibição das proteínas pequenas ligadoras de GTP: Ras, Rho, Rac, interferindo com a ativação de vias de sinalização intracelular (Jasinska e cols., 2007).

Uma molécula de sinalização extracelular pode utilizar várias proteínas como transdutoras ou propagadoras do sinal intracelular. Um destes sistemas é o de proteínas quinases que induzem a ativação do Fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, do inglês Nuclear Factor - $\kappa$ B), envolvido em uma série de processos inflamatórios. Esta molécula está complexada a um inibidor (NF-I $\kappa$ B), cuja fosforilação permite que o NF- $\kappa$ B entre no núcleo ativando a transcrição de diferentes genes relacionados à resposta inflamatória (Li e Verma, 2002). As proteínas Rho e Ras atuam via NF- $\kappa$ B, portanto a inibição dessas proteínas pode levar a redução da atividade do NF- $\kappa$ B, sendo este um dos efeitos pleiotrópicos das estatinas. As MAPKs são proteínas de vias que regulam a atividade de fatores transcricionais, como NF $\kappa$ B e receptor ativado por proliferadores de pexosissomos - PPAR (Cho e cols., 2008). Três membros são importantes: quinases de sinalização extracelular (ERK) associadas à Ras; c-jun N-terminal quinases (JNK) e p38, associadas à Rac. Todas são ativadas por IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e LPS. A sinalização associada às MAPKs e ao NF $\kappa$ B são inibidas

por estatinas levando a uma diminuição na produção de mediadores inflamatórios (Chen e cols., 2004; Ruiz-Velasco e cols., 2004; Terblanche e cols., 2007).

A ativação do sistema imune inato tem sido relacionada à síndrome séptica e à disfunção dos órgãos (Marshall, 2004). As alterações fisiopatológicas que caracterizam a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) são direcionadas pela resposta inflamatória e acredita-se que a sepse seja resultado da produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6, enzimas lisossomais e substâncias vasoativas. Tratamentos que interfiram na cascata inflamatória poderiam, portanto, ser utilizados na sepse (Remick e cols., 2000).

### **1.2.2 Utilização das estatinas em estudos clínicos**

Alguns dados preliminares sugerem que determinados efeitos das estatinas vistos em estudos com modelos animais também podem ser observados em pacientes com sepse. Além disso, os estudos clínicos que descreveram os efeitos das estatinas na doença direcionaram a observação de suas ações não só na redução da severidade e incidência de sepse, mas como também na mortalidade de pacientes que desenvolveram sepse, mas que já estavam sobre tratamento prévio com estatina (Chua e cols., 2007).

Uma análise da *UK General Practice Research Database* identificou que a terapia com estatina reduziu o risco de pacientes diabéticos em desenvolverem pneumonia (van de Garde EM e Bosch JM, 2006). Um estudo prospectivo com 361 pacientes em 2004, onde 50% apresentavam pneumonia, observou uma diminuição da incidência de sepse grave e uma menor taxa de admissão em UTI em pacientes pré-tratados com estatinas (predominantemente sinvastatina) (Almog e cols., 2004).

Em outro estudo realizado com 2.036 pacientes em suspeita de infecção submetidos à emergência constatou que os 412 pacientes em terapia com estatina tiveram redução significativa na mortalidade (Donnino M e N., 2007).

Portanto, dados da literatura sugerem efeitos anti-inflamatórios das estatinas em casos de infecções e de doenças inflamatórias, conferindo proteção no agravamento do quadro clínico levando a um melhor prognóstico, diminuindo a morbidade e a mortalidade dos pacientes.

### 1.2.1 Uso das estatinas em modelos animais

Estudos recentes em modelos *in vitro* têm demonstrado que as estatinas afetam muitas vias envolvidas na patogênese da sepse. Estas ações pleiotrópicas, portanto, fornecem uma base racional para seu uso em doenças inflamatórias, tais como sepse. No entanto, estudos *in vitro* isoladamente não proporcionam uma clara justificativa para estudos clínicos em humanos. É por esta razão que estudos em animais são importantes e devem ser levado em consideração.

Diversos modelos animais têm sido utilizados para estudar os efeitos da terapia com estatinas na sepse. Em um modelo murino de sepse induzida por LPS, o pré-tratamento com cerivastatina significativamente melhorou a sobrevivência dos animais. O pré-tratamento com cerivastatina também reduziu os níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  no tempo de 2 horas, e óxido nítrico, nitrito e nitrato no tempo de 8 horas (Ando e cols., 2000). No modelo de CLP de sepse polimicrobiana, o pré-tratamento com sinvastatina aumentou significativamente a taxa de sobrevivência de 26% para 73%, quando comparados com animais não-tratados (Merx e cols., 2004). Este aumento está relacionado à proteção da função cardíaca e estado hemodinâmico, que foram severamente prejudicados nos camundongos não tratados. Os autores ainda encontraram aumento da adesividade das células mononucleares em ratos sépticos, um importante contribuinte para fisiopatologia da sepse, que por sua vez foi revertida pelo tratamento com estatina (Merx e cols., 2004). Em conjunto, esses estudos fornecem evidências significativas que apóiam os efeitos imunomoduladores das estatinas na sepse (Merx e cols., 2005).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar os efeitos da administração de sinvastatina em camundongos submetidos ao modelo experimental de sepse.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Analisar marcadores bioquímicos da sepse em animais submetidos ao modelo de Ligadura e Perfuração Cecal (CLP), e os efeitos da administração de sinvastatina sobre os mesmos;
- ✓ Investigar os efeitos do tratamento com a sinvastatina sobre parâmetros inflamatórios, através da análise da migração celular e quantificação de citocinas a partir de amostras do lavado peritoneal de animais submetidos ao modelo de CLP;
- ✓ Verificar os efeitos da sinvastatina sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos nas células recuperadas do lavado peritoneal de animais sépticos;
- ✓ Avaliar o clearance bacteriano promovido pelo tratamento com sinvastatina;
- ✓ Avaliar os mecanismos envolvidos com a eliminação bacteriana mediada pelo tratamento com sinvastatina, através da dosagem dos níveis de óxido nítrico no lavado peritoneal e no plasma de animais sépticos;
- ✓ Verificar se a droga sinvastatina favorece melhor eliminação bacteriana por macrófagos peritoneais estimulados com a bactéria *E. coli*;
- ✓ Avaliar a sobrevivência dos animais submetidos ao CLP e tratados e não tratados com sinvastatina;

### **3. Material e métodos**

#### **3.1 Animais**

Camundongos Swiss Webster machos pesando entre 20 e 30 gramas foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em isoladores ventilados (Gabinete Biotério mod. EB-273, Insight, Brasil) no biotério do Pavilhão Ozório de Almeida até o momento do uso, com livre acesso a água e ração, sendo submetidos a um ciclo de 12 horas de claro/escuro. Os animais foram tratados com vermífugo acrescido à água de beber (mebendazol, 20 mg/L de água) durante 3 dias, sendo utilizados até uma semana após o procedimento. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA, FIOCRUZ), protocolo 00260-5 e LW36/10.

#### **3.2 Drogas e soluções**

##### **3.2.1 Preparo de sinvastatina (Sigma-Aldrich) para experimentos *in vivo***

A droga (pró-droga) foi inicialmente pesada de acordo com a dose experimental e solubilizada em DMSO estéril, sendo sonicada a 37 °C durante 1 hora, e acrescida, para diluição, de salina estéril apirogênica (Sanobiol). Foram utilizadas imediatamente após o procedimento.

##### **3.2.2 Preparo de sinvastatina (Calbiochem) para experimentos *in vitro***

Alíquotas estoque de sinvastatina foram inicialmente preparadas a 10mM em DMSO estéril e armazenadas a -20°C, por um período de no máximo 30 dias. Para o preparo das doses de tratamento, as alíquotas foram descongeladas e diluídas em meio RPMI (LCG) estéril e sonicadas por 5 minutos, a 37 °C. A manipulação da droga foi realizada em cabine de biossegurança para manutenção de sua esterilidade.

### 3.2.3 Preparo de Imipenem

O antibiótico Imipenem foi pesado de acordo com a dose de tratamento e diluído em salina estéril apirogênica (Sanobiol). A manipulação da droga foi realizada dentro da cabine de biossegurança para manutenção de sua esterilidade.

### 3.2.4 Preparo de solução salina tamponada por fosfato (PBS) pH = 7,4

#### PBS 10x:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma Aldrich) 1,6g
- NaCl (Merck) 80g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma Aldrich) 2g
- KCl (Merck) 2g
- Água MilliQ (Millipore) q.s.p. 1L

Os sais foram dissolvidos em água MilliQ em um volume de aproximadamente 800 mL. Em seguida, o pH foi corrigido no pHmêtro (Jenway) até alcançar 7,4 e o volume restante foi completado com água MilliQ .

#### PBS 1x:

- PBS 10x 100mL
- Água MilliQ 900mL

### 3.2.5 Líquido de Turk

- Ácido acético glacial (Química) 10mL
- Cristal violeta (Sigma Aldrich) 50mg
- Água MilliQ q.s.p. 500mL

### 3.2.6 TSA – Tryptic Soy Agar

A solução de TSA foi preparada dissolvendo-se 40 g de TSA em 1 litro de água miliQ e esterilizada através de autoclavagem. Após a esterilização, a solução foi plaqueada em placa de Petri. As placas foram colocadas na estufa a 37 °C. Este procedimento foi realizado 24 horas antes da realização do experimento.

### 3.2.7 Soluções para ELISA

#### Tampão de lavagem:

- PBS 1x 1L
- Tween® 20 500µL

#### Tampão de bloqueio:

- PBS 1x 100mL
- BSA (Sigma Aldrich) 1g

#### Tampão de bloqueio + Tween® 20 :

- PBS 1x 100mL
- BSA 1g
- Tween® 20 50 µL

#### Streptavidina-peroxidase:

- Streptavidina-peroxidase (R&D) 25 µL
- Tampão de bloqueio+ Tween® 20 5mL

A solução foi preparada imediatamente antes de seu uso.

### **Solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4N):**

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck) 10,65mL
- Água MilliQ q.s.p. 1L

### **3.3 Indução de sepse polimicrobiana pelo modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP) em camundongos Swiss**

Camundongos swiss oriundos do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz, machos, pesando entre 25 e 35 gramas foram anestesiados através de injeções intraperitoneais de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) 5 minutos antes da realização do procedimento. Após tosa e assepsia local com álcool 70%, o ceco dos animais foi externado através de uma incisão de aproximadamente 1 cm na região abdominal. A ligadura cecal com fio de algodão 4-0 foi seguida de duas perfurações locais com uma agulha de 18G. Uma pequena quantidade de material fecal foi extravasada pelo orifício da punção antes da recolocação do ceco na cavidade abdominal do animal. O abdômen foi suturado em camadas com nylon 3-0 não absorvível. A reposição volêmica foi realizada com 1,0 mL de solução salina estéril por via subcutânea. O tratamento dos animais com simvastatina (Cayman Chemical Company, 2mg/kg) foi realizado através de injeção intravenosa de 100 µL, através do plexo orbital, 6 horas após o procedimento. Para isso, os mesmos foram levemente anestesiados por inalação de isoflurano. E ainda foi administrado antibiótico (Imipenem – Biochimico – dose de 10mg/kg) também 6 horas após a cirurgia. Animais sham operados (sem ligadura e punção cecal) foram utilizados como controles. Animais tratados com salina + veículo (DMSO) foram utilizados como controle negativo.

### **3.4 Avaliação de carga bacteriana e parâmetros celulares**

Vinte e quatro horas após a cirurgia foram coletadas amostras do lavado peritoneal. Após, eutanasiados, os animais foram levados a cabine de biossegurança, de maneira a evitar contaminação com qualquer outro patógeno proveniente do ambiente e todo o procedimento foi realizado dentro da mesma. A pele dos camundongos foi gentilmente seccionada expondo o peritônio. A cavidade

peritoneal foi lavada com 3 ml de salina estéril. Alíquota de 10 µL do lavado foi coletada e diluída 100X e 1000X e posteriormente plaqueada em TSA, em seguida as placas foram alocadas em estufa a 37 °C. Após 24 horas, as placas foram retiradas da estufa para contagem manual de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Para a quantificação de leucócitos totais, as amostras do lavado peritoneal foram diluídas em líquido de Turk (80X) e as células foram contadas na câmara de Neubauer (*Neubauer Improved*) através de visualização ao microscópio óptico (Olympus) nos aumentos de 10X ou 40X. Para a análise diferencial, 60 µL do lavado peritoneal foram citocentrifugados (Cytospin) a 400rpm por 5 minutos. As lâminas foram, em seguida, coradas pelo Panótico rápido (Laborclin), permanecendo imersas por 5 minutos em cada um dos reagentes. A análise diferencial foi realizada pela observação das lâminas coradas em microscópio óptico (Olympus) no aumento de 100x.

Para a quantificação de corpúsculo lipídico, amostras do lavado peritoneal foram diluídas em salina (80X) e citocentrifugadas a 400rpm por 5 minutos. As lâminas foram fixadas em formalina a 3%. Após lavagem em água destilada e secagem das lâminas foi adicionada solução de ácido cacodílico e tetróxido de ósmio (1,5%). Após 30 minutos as lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas com tiocarbohidrazida a 1 % por 5 minutos. Após nova lavagem, foram incubadas novamente com ácido cacodílico e tetróxido de ósmio. Após 3 minutos, os citoesfregaços foram lavados com água destilada, secos e guardados. A contagem foi avaliada por célula, considerando-se um total de 50 células, sob objetiva de imersão (Willingham e Futherford, 1983).

Sobrenadantes do lavado peritoneal gerados pela rotação a 1500 rpm, por 10 minutos em centrífuga, foram armazenados a -20°C para análises posteriores.

### **3.5 Análise bioquímica**

Vinte e quatro horas após a indução de sepse polimicrobiana, os animais foram eutanasiados por inalação de isoflurano. A punção cardíaca foi realizada para coleta de sangue dos animais e posterior análise bioquímica no CECAL.

### **3.6 Avaliação da carga bacteriana em macrófagos peritoneais**

Os animais Swiss receberam uma dose intraperitoneal de 3 ml tioglicolato a 3% (SIGMA). Três dias após foram sacrificados, o lavado peritoneal recolhido e os macrófagos peritoneais foram plaqueados ( $1 \times 10^6$  células por poço) em placas de 24 poços. A placa foi colocada por 2 horas na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para a adesão de macrófagos na superfície da placa. Todas as células não aderentes foram removidas através de 3 lavagens com PBS. Os macrófagos foram tratados com Sinvastatina (5 µM, 10 µM e 20 µM) e 15 minutos após, estimulados com as bactérias *Escherichia coli* (*E.coli*) ( $10^5$  bactérias / ml) por meia hora. Em seguida, o sobrenadante da cultura foi recolhido para a contagem do número de UFC.

### **3.7 Dosagem de citocinas através do Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)**

Placas de fundo chato (Nunc) para ensaio em volume reduzido foram cobertas com o anticorpo de captura (50 µL/poço) e seladas com filme plástico. Após incubação *overnight* a 4°C, as placas foram lavadas 4x com tampão de lavagem (100 µL/poço) e incubadas durante 1 hora com a solução de bloqueio (50 µL/poço) à temperatura ambiente. A curva padrão foi diluída em tampão de bloqueio+ Tween® 20 e aplicada na placa, bem como as amostras (50 µL/poço). Após nova incubação *overnight* a 4°C as placas foram lavadas 6x com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio+ Tween® 20 (50µL/poço) foi adicionado. Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 8x com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (50µL/poço). Trinta minutos após a incubação no escuro, foi acrescida a solução de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (*TMB*, *Sigma Aldrich*), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento satisfatório de cor na curva-padrão, a reação foi parada com solução de parada (50µL/poço) e a absorbância a 450 nm foi determinada pela leitora de placas.

Citocina	Anticorpo de captura	Curva de citocina recombinante	Anticorpo de detecção
IL-6 (R&D, dual set)	2µg/mL	(1000pg/mL-15,6pg/mL)	0,2µg/mL
IL-1β(R&D, dual set)	4µg/mL	(2500pg/mL- 39,1pg/mL)	0,4µg/mL
TNF (R&D, dual set)	1µg/mL	(2000pg/mL- 31,3pg/mL)	0,25µg/mL
MIF* (R&D, dual set)	2µg/mL	(2000pg/mL- 31,3 pg/mL)	0,1µg/mL

\* Anticorpos desenvolvidos para ensaios com amostras de humanos. Apresentam reatividade cruzada com amostras de camundongo.

### 3.8. Análise de óxido nítrico

Como o NO possui uma vida curta, a produção de NO foi estimada pelo acúmulo de nitrito (NO<sub>2</sub>), um produto estável da oxidação do NO, usando o reagente de Griess. A reação de Griess quantifica a presença de nitrito por espectrofotometria, pois ocorre a formação de um composto de coloração rosada quando o nitrito é tratado com o reagente de Griess. As amostras foram então colocadas em poços de placas de 96 poços e em seguida foi adicionado 100 µL do reagente de Griess (Sigma). O reagente também foi adicionado à curva. Foram utilizados 100 µL da diluição em cada poço. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas, com comprimento de onda de 540 nm (Spectramax 190 – Molecular Devices – US). A produção de NO<sub>2</sub> foi quantificada através de comparação à curva padrão.

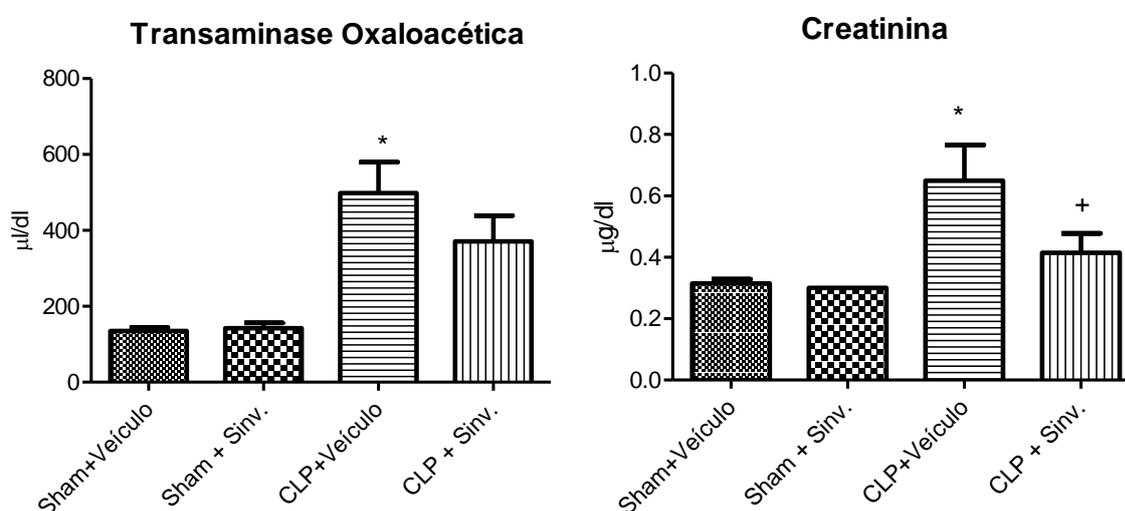
### 3.9. Análise estatística

A análise estatística foi feita pelo teste Anova (Newman-Keuls) no software *GraphPad prism* versão 5. Os dados quantitativos são mostrados como média + erro padrão da média (*SEM*) e o nível de significância foi estabelecido como  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas das curvas de sobrevivência foi utilizado o teste Mantel-Cox logrank, onde as diferenças significativas foram com valor de  $P < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Efeito da sinvastatina na função renal e hepática de animais submetidos ao CLP

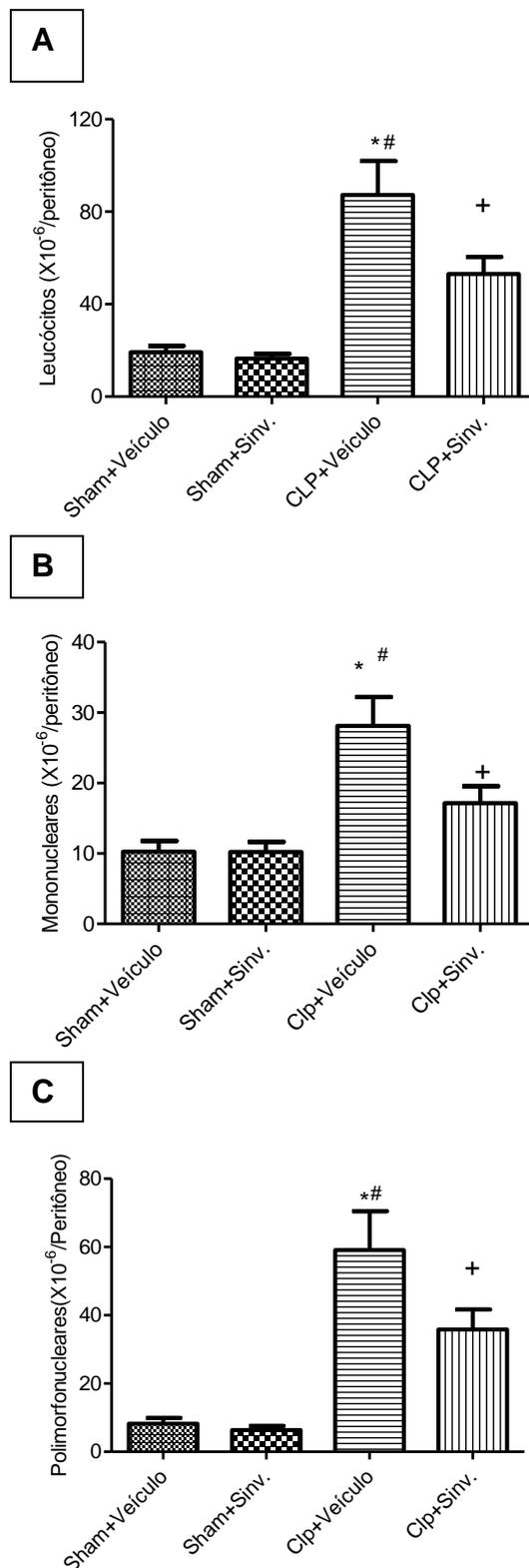
Para dar início as nossas investigações nós avaliamos o efeito da sinvastatina em marcadores bioquímicos de função hepática e renal, na sepse no modelo de CLP. Como mostrado na figura 4.1 A e 4.1 B, o tratamento com sinvastatina levou a uma diminuição significativa do nível de creatinina. Houve também redução dos níveis de transaminase oxaloacética, porém não significativa.



**Figura 4.1. Efeito da sinvastatina na função renal e hepática de animais submetidos ao CLP.** Camundongos SW submetidos ao CLP e tratados ou não com sinvastatina tiveram o sangue retirado através de punção cardíaca 24 horas após a cirurgia para a análise bioquímica. Dados representados como média + erro padrão da média (E.P.M.) (n= 6). (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo sham+veículo, (+) em relação ao grupo CLP+veículo.

#### **4.2. Análise da celularidade do lavado peritoneal de camundongos Swiss submetidos ao CLP e tratados com sinvastatina**

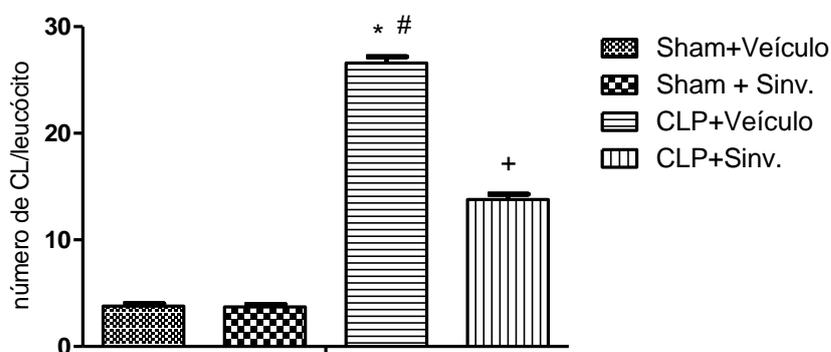
Parâmetros inflamatórios nos animais operados e tratados com sinvastatina foram analisados. Investigamos os efeitos quantitativos e qualitativos da droga sobre a população de células presentes em amostras do lavado peritoneal. Para isso, camundongos *SW* submetidos ao CLP foram tratados ou não com sinvastatina 6 horas após a cirurgia. O lavado peritoneal foi recolhido 24 horas após o CLP para contagem de leucócitos totais e determinação da contagem diferencial. Como indicado nas figuras 4.2. A, 4.2. B e 4.2. C, a análise das amostras do lavado peritoneal revelou uma diminuição no número de leucócitos totais (4.2. A), tanto de células mononucleares (4.2. B) como de polimorfonucleares (4.2. C).



**Figura 4.2. Análise da celularidade de amostras do lavado peritoneal de camundongos Swiss submetidos ao CLP e tratados com simvastatina.** Camundongos Swiss submetidos ao CLP e tratados ou não com simvastatina tiveram seu lavado peritoneal coletado 24 horas após a indução de sepse para a análise de celularidade. Dados representados como média + EPM (n= 11). (\* e #)  $p < 0,05$  em relação aos grupos sham e (+) em relação ao grupo CLP+veículo.

### 4.3. Efeito da sinvastatina na formação de corpúsculos lipídicos em células do lavado peritoneal

Com o objetivo de avaliar o efeito da sinvastatina na ativação celular, foram feitos citoesfregaços a partir de amostras do lavado peritoneal de camundongos submetidos ao CLP, tratados ou não com sinvastatina. Posteriormente as lâminas foram coradas com ósmio para a contabilização de corpúsculos lipídicos em microscopia óptica. A figura 4.3 mostra que a droga foi capaz de causar uma diminuição significativa no número dessas organelas em leucócitos provenientes do lavado peritoneal.

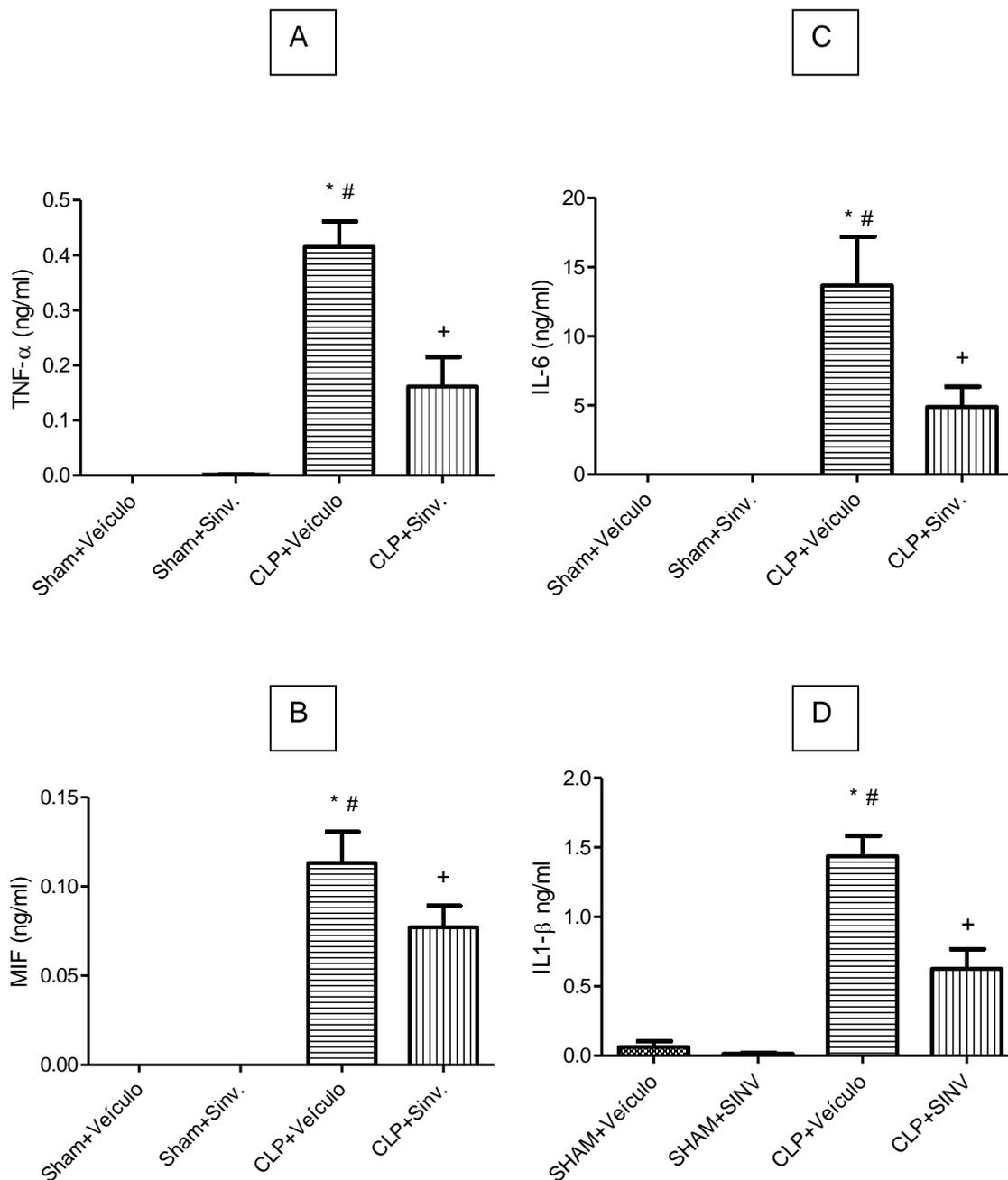


**Figura 4.3. Efeito da sinvastatina na formação de corpúsculos lipídicos em células do lavado peritoneal de animais submetidos ao CLP.** Animais SW foram submetidos ao CLP e tratados com sinvastatina como descrito em materiais e métodos. Os corpúsculos lipídicos foram enumerados de 50 células de cada animal por microscopia óptica (N=10). Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M. (\* e #) CLP vs sham+veículo e sham+sinv., respectivamente; (+) CLP+sinv. VS CLP+veículo,  $P < 0,05$ .

#### **4.4. Análise dos efeitos do tratamento com sinvastatina sobre os mediadores solúveis em camundongos *Swiss* submetidos à sepse**

Para investigar a implicação do tratamento com a droga em mecanismos envolvidos na resposta inflamatória causada pela sepse foram investigados os mediadores solúveis que poderiam estar participando desse processo. Nos sobrenadantes do lavado peritoneal foram determinados os níveis das citocinas IL-6, MIF, TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ .

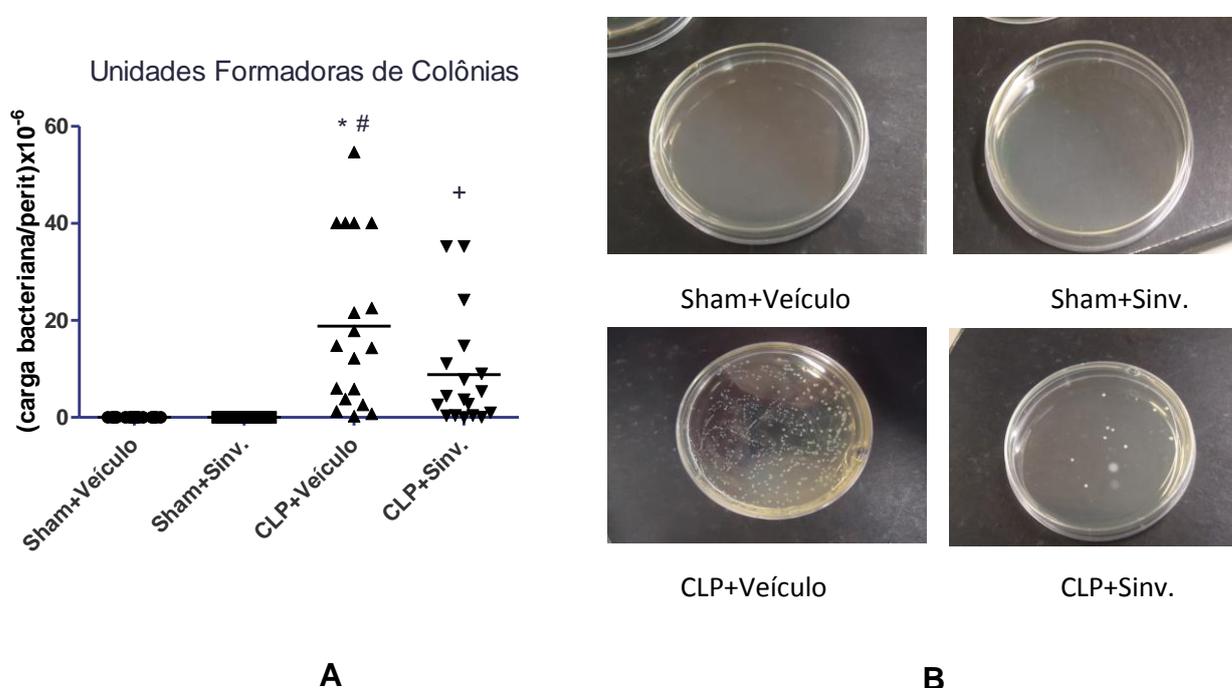
Os resultados revelaram que dentre as citocinas analisadas, o TNF- $\alpha$  (figura 4.4. A), MIF (figura 4.4. B), IL1- $\beta$  (figura 4.4 C) e IL-6 (figura 4.4 D) tiveram seus níveis significativamente diminuídos pelo tratamento com sinvastatina, indicando um possível papel anti-inflamatório da droga no modelo experimental utilizado.



**Figura 4.4. Efeito do tratamento com sinvastatina nos níveis de mediadores solúveis provenientes do sobrenadante do lavado peritoneal de animais submetidos ao CLP.** Camundongos SW submetidos ao CLP, tratados e não tratados com sinvastatina (2mg/kg), 6 horas após a cirurgia, tiveram o lavado peritoneal coletado 24 horas depois. Nos sobrenadantes destas amostras foram determinados os níveis de TNF- $\alpha$  (A), MIF (B), IL-6 (C), IL1- $\beta$  (D). Dados representados como média + E.P.M. (8 – 17/grupo). (\* e #)  $p < 0,05$  em relação ao grupo sham+veículo e sham+sinov. (respectivamente) e (+) em relação ao grupo CLP+Veículo.

#### 4.5. Avaliação dos efeitos do tratamento com sinvastatina sobre a eliminação bacteriana em animais submetidos ao CLP

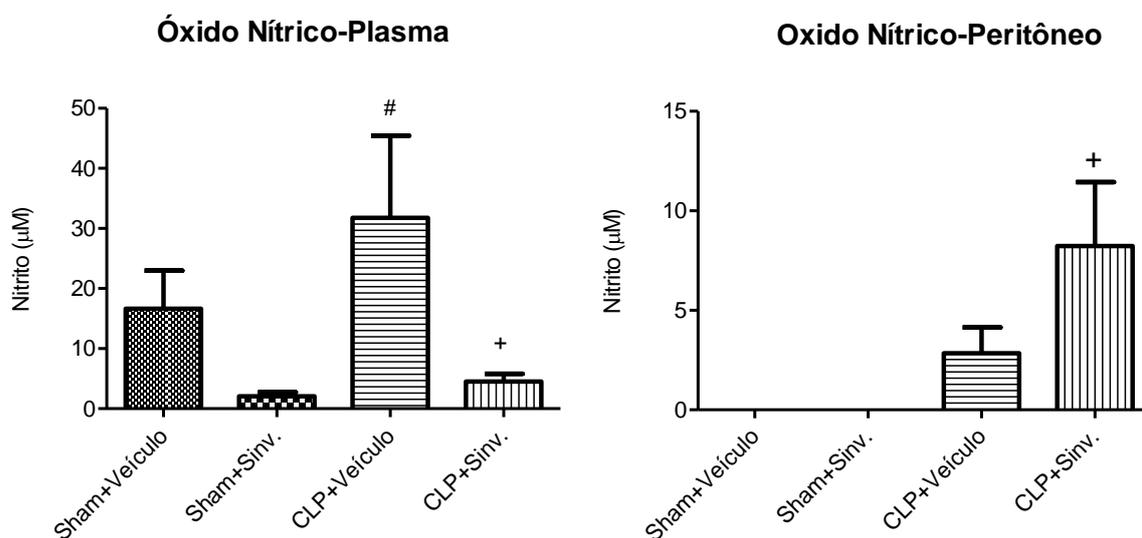
Para avaliar se o tratamento com a sinvastatina interfere na eliminação bacteriana, animais submetidos ao CLP e tratados com a droga 6 horas após o procedimento cirúrgico, tiveram suas cavidades peritoneais lavadas após 24 horas. O lavado peritoneal foi recolhido e alíquotas deste lavado foram plaqueadas em placas contendo meio de cultura para crescimento bacteriano (TSA) e 24 horas após o plaqueamento, o número de unidades formadoras de colônia (CFU) foi contado. Como podemos observar na figura 4.5, o tratamento com a sinvastatina diminuiu o número de CFU no lavado peritoneal dos animais submetidos ao CLP.



**Figura 4.5. Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a eliminação bacteriana em animais submetidos ao CLP.** A) Camundongos SW submetidos ao CLP foram tratados com sinvastatina ou veículo 6 horas após o procedimento cirúrgico. 24 horas após a indução de sepse alíquotas do lavado peritoneal foram plaqueadas para análise de CFU (A). Foto representativa do gráfico exposto, de pelo menos 8 animais por grupo (B). Dados representados como média (8 - 20). (\* e #)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham+Veículo e Sham+Sinv. (respectivamente) e (+) em relação ao grupo CLP+Veículo

#### 4.6. Efeito do tratamento com sinvastatina nos níveis de óxido nítrico no plasma e no peritônio de camundongos submetidos ao CLP

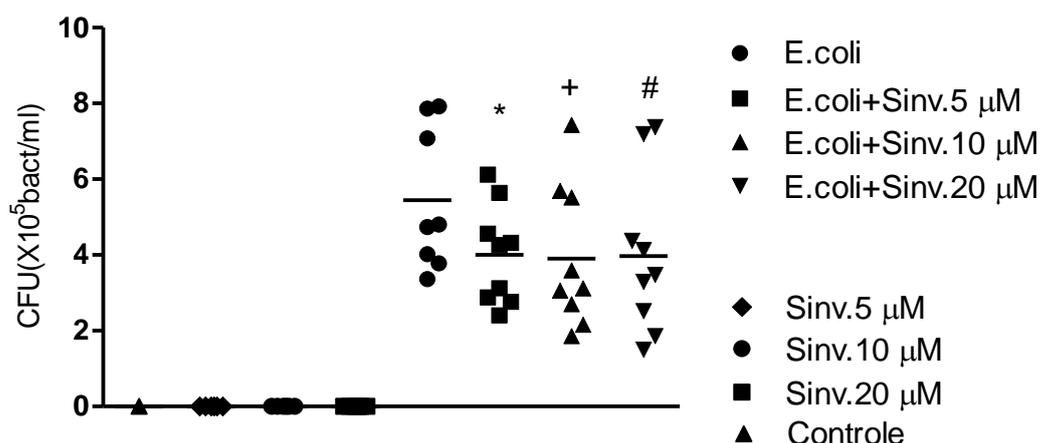
Animais SW foram submetidos ao CLP e tratados com sinvastatina (2 mg/kg) por via intravenosa 6 horas após a cirurgia. 24 horas após a indução de sepse, amostras sanguíneas foram retiradas por punção cardíaca. A dosagem de óxido nítrico foi realizada a partir do plasma coletado e do sobrenadante proveniente de amostra do lavado peritoneal. Como mostra a figura 4.6, a sinvastatina foi capaz de promover uma redução dos níveis de óxido nítrico do plasma, enquanto que, no peritônio, foi observado um aumento significativo dos níveis de óxido nítrico.



**Figura 4.6 - Efeito da sinvastatina na produção de óxido nítrico no plasma e peritônio de camundongos SW sépticos.** Animais submetidos ao CLP receberam sinvastatina intravenosa (2mg/kg) 6 horas após a cirurgia. Após 24 horas, óxido nítrico foi quantificado do plasma e do sobrenadante do lavado peritoneal destes animais. Os dados representam um experimento com n=8 animais por grupo. (\*) CLP vs SHAM.(+) CLP vs sinvastatina onde, P<0,05.

#### 4.7 Efeito da sinvastatina em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com a bactéria *Escherichia coli*

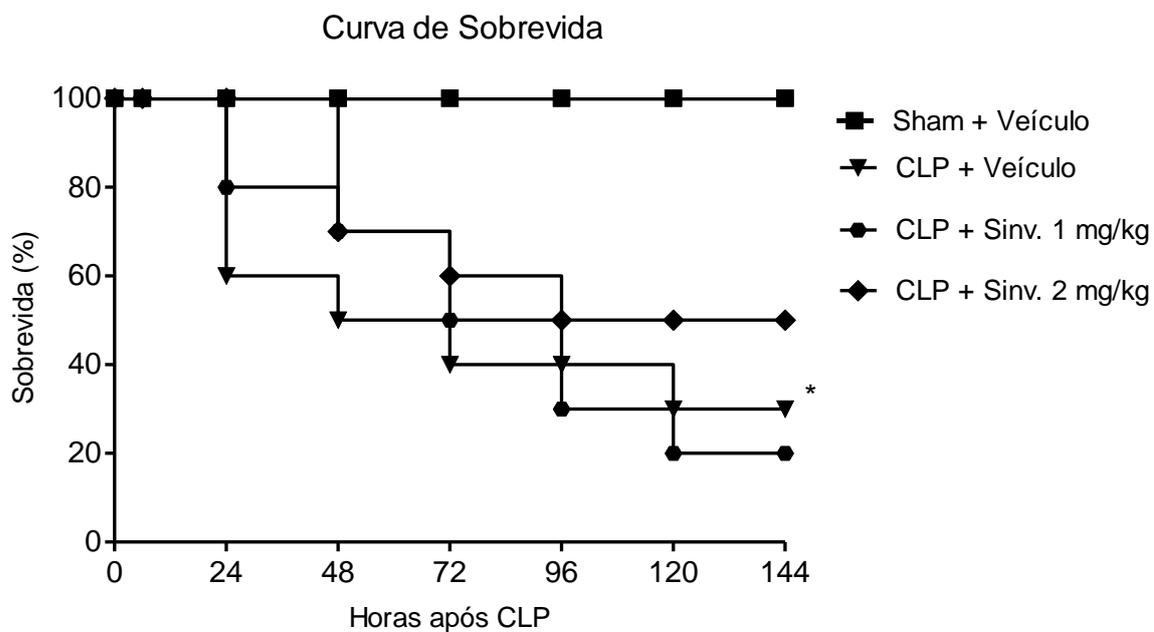
A fim de correlacionar os dados encontrados *in vivo* sobre o efeito da administração de sinvastatina na eliminação bacteriana decidimos verificar a implicância do tratamento com sinvastatina em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss*. Para isso, a contagem de unidades formadoras de colônia foi realizada conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados mostram que a sinvastatina, em todas as doses aplicadas, foi capaz de diminuir o número de CFU (Figura 4.7).



**Figura 4.7 - A sinvastatina favorece uma melhor eliminação de bactérias por macrófagos peritoneais estimulados com a bactéria *E. coli*.** Os macrófagos foram pré-tratados com a sinvastatina (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) e 1 hora após estimulados com a bactéria *E. coli*. Meia hora após, o sobrenadante foi alíquotado com placas contendo TSA para contagem do número CFU. N=6 animais, com triplicata para cada animal. (\*, + e #) *e.coli* +Sinv. 5  $\mu$ M, *e.coli*+sinv. 10  $\mu$ M e *e.coli* +sinv.20  $\mu$ M, respectivamente, VS *E.coli*, onde,  $P < 0,05$ .

#### **4.8 Efeito do tratamento com sinvastatina na sobrevida de animais submetidos ao CLP**

Uma vez que a sinvastatina foi capaz de alterar parâmetros inflamatórios importantes nos animais sépticos resolvemos avaliar seu efeito na mortalidade de animais submetidos ao CLP. Utilizamos também a dose de 1mg/kg a fim de avaliar inicialmente o efeito de uma dose inferior na mortalidade desses animais. Para isso, realizamos uma curva de sobrevida de camundongos *SW* após a indução de sepse através do modelo de CLP. A curva de sobrevida dos animais foi observada diariamente por um período de 7 dias. Como observado na figura 4.8, a dose de 2 mg/kg foi capaz de conferir uma maior proteção aos animais, sendo essa proteção de 100% no tempo de 24 horas após a indução de sepse. A dose de 1 mg/kg também foi capaz de promover uma proteção aos animais sépticos, porém foi menor do que a observada com a dose de 2 mg/kg no tempo 24 horas. Utilizamos diferentes protocolos, dentre eles: tratamento com sinvastatina 6, com reforço 24 e 48 horas, pré-tratamento com 2 horas, seguindo com outras doses 6, 24 e 48 horas (resultados não mostrados). Também testamos diferentes vias de administração, além da via intravenosa, testamos a via intraperitoneal e a via subcutânea (dados não mostrados). Tanto as doses de 1 mg/kg e 2 mg/kg não conferiram proteção em relação ao CLP em nenhum protocolo experimental utilizado.



**Figura 4.8** Efeito do tratamento com sinvastatina na mortalidade de animais submetidos ao CLP. Camundongos Swiss foram tratados com sinvastatina (1 mg/kg e 2 mg/kg) 6 horas após a indução de sepse. Animais controle receberam injeção com salina estéril apirogênica acrescida de DMSO a 0,1% (veículo). O grupo experimental consiste de 10 animais. Resultado representativo de 5 experimentos independentes. (\*) CLP+veículo vs Sham+veículo

## 5. Discussão

Sepse é uma síndrome clínica altamente heterogênea e dinâmica, amplamente definida como uma resposta sistêmica do hospedeiro a uma infecção. Originalmente considerava-se que a sepsse consistia, somente ou principalmente, em uma inflamação excessiva provocada por alta carga bacteriana. Atualmente, sabe-se que na sepsse ocorre um desequilíbrio entre reações pró-inflamatórias (responsáveis pela morte de patógenos invasores e também por dano tecidual) e reações anti-inflamatórias (responsáveis por limitar a inflamação e também por acarretar uma vulnerabilidade do hospedeiro a infecções tardias). A teoria popularizada a partir das ideias de Lewis Thomas é a de que, na sepsse, é a resposta do hospedeiro que determina a doença, ao contrário da ideia mais comum, onde as consequências de uma infecção se dão devido à invasão do patógeno (Rittirsch e cols., 2008). De fato, estudos pré-clínicos demonstraram que este desbalanço de mediadores impede a manutenção da homeostasia do indivíduo (von Knethen e cols., 2007; Yang e Chen, 2008) e está amplamente aceito que a consequência da sepsse é mais fatal do que a invasão do patógeno propriamente dita.

A sepsse é uma doença desafiadora na medicina e esforços consideráveis têm sido realizados para um melhor entendimento da inflamação sistêmica que caracteriza essa síndrome. Seu reconhecimento muitas vezes ainda não acontece em tempo hábil, deixando margem para a ocorrência da disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (O'Brien e cols., 2007). Apesar de uma quantidade considerável de estudos do mecanismo da sepsse e investimento em estudos clínicos, nenhuma terapia cujo alvo seja a cascata inflamatória tem se mostrado capaz de alterar a mortalidade na sepsse (Almog, 2003; Sevransky e cols., 1997). É altamente reconhecido que interferência na tentativa de alterar a patogênese e a resposta do hospedeiro na sepsse deve ser capaz de modificar os diferentes níveis da cascata inflamatória. Intervenções terapêuticas no manejo da sepsse e choque séptico representam um desafio clínico e novas abordagens e estratégias continuam a ser desenvolvidas.

A classe de drogas inibidoras da HMG-CoA redutase (estatinas) foi introduzida nos anos 80 na prática clínica e hoje está entre as drogas mais prescritas em todo o mundo. A HMG-CoA redutase, é uma enzima que participa de uma etapa limitante na biossíntese do colesterol, por isso as estatinas são

amplamente utilizadas para diminuir níveis de colesterol sérico e como prevenção de doenças cardiovasculares (Cannon e cols., 2004; Kumana e cols., 2003; Ray e Cannon, 2004). Uma vez que a HMG-CoA redutase está envolvida na biossíntese do colesterol, essas drogas atuam aumentando a expressão de receptores para LDL nos hepatócitos, o que resulta em um acréscimo da captação do colesterol com consequente diminuição de seus níveis séricos (Maron e cols., 2000). A síntese do colesterol é inibida uma vez que a HMG-CoA redutase é responsável pela conversão da HMG-CoA em mevalonato, que não é somente o precursor do colesterol, mas também de muitos compostos não-esteroidais isoprenóides exercendo um papel-chave em diversos processos celulares (Arnaud e cols., 2005). Acredita-se que a atuação da droga sobre pequenas GTPases de membrana, como Ras, Rho e Rac quinases seja o principal mecanismo que confere os efeitos pleiotrópicos adicionais a propriedade de diminuição lipídica dessa classe de drogas (Kouroumichakis e cols., 2011).

Os inibidores da HMG-CoA redutase têm emergido como poderosos inibidores do processo inflamatório, porém apesar das evidências sobre o potencial anti-inflamatório das estatinas, os mecanismos pelos quais elas exercem esses efeitos ainda não são bem compreendidos. Sendo assim, na tentativa de melhor compreender as ações anti-inflamatórias das estatinas *in vivo*, em nosso trabalho foi avaliado o efeito da sinvastatina no modelo experimental de sepse. Diferentes tipos de modelos experimentais em animais têm sido utilizados para estudar a fisiopatologia da sepse, entretanto diversos estudos mostram que uma das falhas na tradução de resultados em animais para humanos é a utilização de modelos experimentais que não mimetizam de maneira completa a sepse humana (Dyson e Singer, 2009).

O modelo empregado no presente estudo compreende o modelo de CLP. Este é, atualmente, o modelo animal de sepse mais amplamente utilizado, sendo o que mais se aproxima da sepse humana. A manipulação cirúrgica no CLP permite que a severidade da doença seja ajustada, causando disseminação de múltiplas espécies de bactérias na corrente sanguínea e uma resposta inflamatória sistêmica progressiva seguida de choque séptico e injúria de múltiplos órgãos (Holly e cols., 2006). Em nosso estudo, os animais sujeitos a este modelo apresentaram resposta inflamatória intensificada, alta taxa de mortalidade e alteração na migração celular, assemelhando-se, portanto, a perfis encontrados em pacientes sépticos.

Em um estudo utilizando estatina no tratamento de camundongos C57BL/6 submetidos à sepse através do CLP, foi demonstrado aumento da sobrevivência desses animais, bem como melhoras nas funções cardiovasculares, tanto em pré-tratamento quanto em pós-tratamento com sinvastatina associada à antibiótico, 6 e 18 horas após a indução de sepse (Merx e cols., 2004; Merx e cols., 2005). A fim de aproximar o nosso modelo ao estado clínico da sepse, foram adotados animais não isogênicos para a realização dos experimentos, onde camundongos SW foram submetidos à ligadura e perfuração cecal e tratados com uma única dose de sinvastatina 6 horas após a cirurgia. A reposição volêmica e o uso de antibióticos são a primeira linha estratégica no tratamento da sepse, estes também foram aplicados em nosso modelo (Bochud e cols., 2001).

O fígado e rim são órgãos importantes afetados na sepse sendo a disfunção destes órgãos associada à alta mortalidade. O fígado é fortemente afetado pela bacteremia presente na sepse e tem suas funções alteradas em decorrência da resposta inflamatória sistêmica (Maynard e cols., 1997; Pastor e cols., 1995). A insuficiência renal aguda (IRA), por sua vez, é uma complicação comum no paciente grave (Klenzak e Himmelfarb, 2005; Soubrier e cols., 2006).

Em nossos estudos os animais submetidos ao CLP apresentaram altos níveis de transaminase oxaloacética e creatinina, refletindo disfunção hepática e renal, respectivamente. Estudos prévios mostraram que a sinvastatina foi capaz de diminuir danos no fígado provocado por endotoxemia (Slotta e cols., 2009). Em nosso modelo houve pequena alteração dos níveis de transaminase oxaloacética, também conhecida como aspartato aminotransferase, no soro dos animais submetidos ao CLP e tratados com sinvastatina. Por outro lado, o pós-tratamento com sinvastatina se mostrou capaz de diminuir significativamente os níveis de creatinina no soro dos animais submetidos ao CLP, sugerindo um efeito benéfico desta droga na disfunção renal provocada pelo quadro de sepse. Dados na literatura corroboram com os nossos resultados, pois demonstram que um pré-tratamento com sinvastatina melhora a função renal de camundongos C57/BL6 com Insuficiência Renal Aguda (AKI, do inglês, *Acute Renal Dysfunction*) induzida por sepse (Yasuda e cols., 2006).

Um estudo em ratos submetidos ao CLP demonstrou que o pré-tratamento com sinvastatina foi capaz de alterar a celularidade no sangue desses animais, com redução do acúmulo de neutrófilos (Souza Neto JL, 2006). Já foi visto que estatinas são capazes de reduzir a expressão de moléculas de adesão em monócitos

circulantes de pacientes com hipercolesterolemia (Rezaie-Majd e cols., 2003), como em células endoteliais (Prasad e cols., 2005) podendo explicar a diminuição da migração deste tipo celular para o sítio da infecção. Em nosso estudo, a análise de parâmetros celulares de amostras do lavado peritoneal revelou que o tratamento com sinvastatina foi capaz de reduzir o número de células totais presentes no local da infecção. Foi observada uma significativa diminuição tanto do influxo de células mononucleares quanto de células polimorfonucleares.

Uma vez observada a redução do número de células no local da infecção, nós optamos por avaliar outro parâmetro associado à ativação celular durante a resposta inflamatória. Os corpúsculos lipídicos são sítios de compartimentalização de enzimas formadoras de mediadores lipídicos da inflamação (Bozza e cols., 2009), tendo a sua produção aumentada na sepse, portanto indicando a gravidade da doença (Bozza e Bandeira-Melo, 2005). Portanto na tentativa de avaliar a ativação celular, estas organelas foram quantificadas. Nossos experimentos demonstram uma alteração no número de corpúsculos lipídicos, havendo diminuição significativa dessas organelas em células provenientes do lavado peritoneal de animais tratados com a droga, o que ainda não foi demonstrado na literatura. Esta diminuição pode estar associada a uma menor produção de mediadores lipídicos da inflamação, que atuam como agentes quimiotáticos tanto para células mononucleares quanto para neutrófilos. Portanto, a diminuição destes corpúsculos lipídicos poderia evitar um influxo celular intenso, o qual foi observado em nossos resultados, e também impedir maior lesão tecidual causada pela resposta inflamatória exacerbada.

Já foi demonstrado que um pré-tratamento com sinvastatina em ratos submetidos ao CLP foi capaz de diminuir os níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no soro desses animais (Souza Neto JL, 2006) e ainda que a cerivastatina foi capaz de reduzir a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-6 em camundongos após desafio com LPS (Chaudhry e cols., 2008). Para avaliar o efeito da sinvastatina no nosso modelo, as concentrações de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e MIF foram quantificadas no foco da infecção de camundongos tratados ou não com a droga. Estas citocinas são consideradas pró-inflamatórias e ocupam uma posição central na fisiopatologia da sepse e resposta inflamatória a agentes infecciosos.

O TNF- $\alpha$  é um dos mediadores responsáveis pela disfunção orgânica e aumento da letalidade durante a sepse (Gaur e Aggarwal, 2003; Gordon e cols., 2004). O MIF, por sua vez é capaz de regular positivamente TLR-4 e TNF- $\alpha$  por macrófagos (Roger e cols., 2001a; Roger e cols., 2001b). A citocina IL-6 possui uma

variedade de efeitos biológicos e participa na indução da resposta de fase aguda (Kluger e cols., 1998; LeMay e cols., 1990; Leon e cols., 1998). Estudos na literatura mostram a citocina IL-6 como um importante biomarcador da sepse e fator prognóstico em seu curso (Hack e cols., 1989). Já a participação da IL-1 $\beta$  na fisiopatologia da sepse foi demonstrada a partir da utilização de um antagonista para seu receptor e observação da letalidade diminuída em coelhos em modelo de endotoxemia (Ohlsson e cols., 1990) e injeção de *E.coli* (Wakabayashi e cols., 1991). A IL-1 $\beta$  funciona também em conjunto com o TNF- $\alpha$  estimulando a liberação sistêmica de IL-6 (Dinarello, 1997). Nossas análises demonstraram que o tratamento com sinvastatina foi capaz de diminuir significativamente os níveis das citocinas avaliadas podendo contribuir para um quadro inflamatório mais brando.

Em um estado saudável e sob condições patológicas o óxido nítrico é capaz de manter a homeostasia da microcirculação, regulando o tônus microvascular, a adesão de leucócitos, adesão plaquetária e permeabilidade microvascular (Trzeciak e cols., 2008). O óxido nítrico, contudo, apresenta papéis opostos na sepse. Enquanto sistemicamente sua superprodução é responsável por efeitos prejudiciais, causando vasodilatação e agindo como mediador da inflamação, localmente ele atua como um potente agente bactericida (Nava e cols., 1991). Foi demonstrado que a sinvastatina diminui a superprodução de óxido nítrico em modelo de choque endotóxico em ratos (Greenwood e Mason, 2007). Em nosso trabalho avaliamos os níveis de óxido nítrico no plasma e no sobrenadante proveniente do lavado peritoneal de camundongos submetidos ao CLP e tratados com sinvastatina. Nossos resultados mostram uma diminuição nos níveis de óxido nítrico no plasma dos animais tratados com sinvastatina, corroborando com os dados observados na literatura, logo sugerindo que a droga pode ter um efeito benéfico na disfunção endotelial observada na sepse. Localmente a sinvastatina mostrou ser eficaz no aumento da produção de óxido nítrico, sendo esta significativamente maior nos animais tratados podendo estar associado a uma maior eliminação bacteriana.

O propósito primordial da ativação da resposta inflamatória é eliminar a carga bacteriana prevenindo a disseminação do patógeno. Como mencionado acima, um dos mecanismos que envolvem a eliminação bacteriana é a produção de NO no sítio da infecção (Wink e cols, 2011). O papel do NO como microbicida já é bem descrito na literatura (Wink e cols., 2011). Por conseguinte, uma vez que nossos estudos mostraram um aumento dos níveis de NO do lavado peritoneal de camundongos submetidos ao CLP e tratados com sinvastatina, nós investigamos a carga

bacteriana no foco infeccioso. Neste sentido realizamos a contagem do número de CFU a partir de amostras do lavado peritoneal de animais tratados ou não com a droga. Nossos resultados mostram uma diminuição significativa no número de colônias bacterianas no lavado peritoneal. Portanto, os dados encontrados sugerem que a sinvastatina pode estar agindo na eliminação bacteriana através da indução da produção de óxido nítrico no local da infecção.

A fim de correlacionar com os nossos dados obtidos *in vivo*, nós avaliamos o papel da sinvastatina sobre macrófagos peritoneais estimulados com a bactéria *E.coli*, através da contagem de CFU a partir do sobrenadante destas células. Nossos dados mostram que o tratamento com sinvastatina foi capaz de reduzir a carga bacteriana *in vitro*, confirmando o papel da droga na eliminação bacteriana e mostrando que o macrófago pode ser uma das células envolvidas na redução do crescimento bacteriano observado após o tratamento com sinvastatina.

Já foi demonstrado que um pré-tratamento com estatinas é capaz de aumentar a sobrevida de animais submetidos ao CLP e que esse aumento foi acompanhado de melhoras nas funções cardiovasculares desses animais (Merx e cols., 2004). Estudos recentes mostram que o inibidor da farnesiltransferase, FTI-277, foi capaz de reduzir a mortalidade de camundongos sépticos. A farnesiltransferase é uma enzima que participa da prenilação de proteínas, sendo crítica na regulação de seus mecanismos (Yang e cols., 2010). Para avaliar o efeito do pós-tratamento com sinvastatina sobre a mortalidade de camundongos submetidos ao CLP, a mortalidade dos animais tratados ou não com a droga foi observada durante sete dias após a indução de sepse. Contrastando com dados da literatura nossos resultados mostram que a sinvastatina não causou um aumento significativo na sobrevida dos animais submetidos ao CLP, mesmo quando utilizamos diferentes protocolos experimentais.

Em conjunto nossos resultados mostram que o pós-tratamento de animais submetidos ao CLP com sinvastatina foi capaz de alterar parâmetros inflamatórios de grande relevância na sepse. A sinvastatina promoveu a redução dos níveis de mediadores inflamatórios, redução da ativação e migração celular, bem como a diminuição dos níveis de óxido nítrico na circulação e o aumento deste mediador no local da infecção e a redução da carga bacteriana tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Nossos dados também sugerem que as alterações observadas na fisiopatologia podem estar associadas a uma melhora clínica, como vista na função renal, dos animais tratados com sinvastatina. Desta forma, nossas análises indicam que os

efeitos da sinvastatina estão relacionados aos efeitos da fisiopatologia da sepse, o que torna de grande importância a contínua avaliação de seus mecanismos de ação, para que possivelmente esta droga seja considerada como terapia adjuvante no tratamento da sepse.

## 6. Conclusões

- ✓ O tratamento com sinvastatina foi capaz de reduzir significativamente os níveis de creatinina no soro dos animais submetidos ao CLP;
- ✓ O tratamento com a sinvastatina (2 mg/kg) se mostrou eficaz em reduzir a inflamação peritoneal causada pelo CLP, diminuindo a migração de leucócitos;
- ✓ A indução de corpúsculos lipídicos no modelo de CLP é reduzida pelo tratamento com sinvastatina (2 mg/kg);
- ✓ O tratamento com sinvastatina (2 mg/kg) foi capaz de diminuir os níveis das citocinas pró-inflamatórias MIF e TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL-6 mostrando um possível papel anti-inflamatório da droga no modelo aplicado;
- ✓ A sinvastatina (2 mg/kg) foi capaz de reduzir o número de unidades formadoras de colônias no peritônio de animais submetidos ao CLP, mostrando um papel desta droga na eliminação bacteriana;
- ✓ O tratamento com sinvastatina (2 mg/kg) foi capaz de reduzir os níveis de óxido nítrico sistemicamente e, por outro lado, aumentar os níveis deste mediador no sítio da infecção;
- ✓ A administração de sinvastatina em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss estimulados com a bactéria *E.coli* foi capaz de reduzir o número de unidades formadoras de colônias *in vitro*;
- ✓ Embora as alterações observadas nos parâmetros inflamatórios analisados, a sinvastatina não foi capaz de conferir aumento significativo da sobrevivência dos animais submetidos ao CLP;

## **7. Perspectivas do Projeto**

- ✓ Avaliação de parâmetros moleculares, como o envolvimento do receptor PPAR e MAP quinases nos efeitos da sinvastatina;
- ✓ Avaliação do tratamento com mevalonato a fim de determinar a dependência da produção deste intermediário nos efeitos antiinflamatórios observados;

## 7. Referências

- Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4, 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124, 783-801.
- Almog, Y., 2003. Statins, inflammation, and sepsis: hypothesis. *Chest.* 124, 740-3.
- Almog, Y., Shefer, A., Novack, V., Maimon, N., Barski, L., Eizinger, M., Friger, M., Zeller, L., Danon, A., 2004. Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. *Circulation.* 110, 880-5.
- Ando, H., Takamura, T., Ota, T., Nagai, Y., Kobayashi, K., 2000. Cerivastatin improves survival of mice with lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Pharmacol Exp Ther.* 294, 1043-6.
- Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., Pinsky, M.R., 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 29, 1303-10.
- Angus, D.C., Wax, R.S., 2001. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med.* 29, S109-16.
- Angus, D.C., Pereira, C.A., Silva, E., 2006. Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 6, 207-12.
- Annane, D., Aegerter, P., Jars-Guinestre, M.C., Guidet, B., 2003. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med.* 168, 165-72.
- Arnaud, C., Veillard, N.R., Mach, F., 2005. Cholesterol-independent effects of statins in inflammation, immunomodulation and atherosclerosis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 5, 127-34.
- Bacher, M., Metz, C.N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T., Bucala, R., 1996. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 7849-54.
- Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H.Y., Mu, W., Metz, C.N., Chesney, J.A., Calandra, T., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R.C., Bucala, R., 1997. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol.* 150, 235-46.
- Balk, R.A., 2000. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin.* 16, 179-92.
- Benjamim, C.F., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2000. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis.* 182, 214-23.
- Benjamim, C.F., Hogaboam, C.M., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., 2003. Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol.* 163, 2605-17.
- Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R.A., Martin, S.B., Tracey, K.J., Voelker, W., Manogue, K.R., Cerami, A., Bucala, R., 1993. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature.* 365, 756-9.

- Biasucci, L.M., Biasillo, G., Stefanelli, A., 2010. Inflammatory markers, cholesterol and statins: pathophysiological role and clinical importance. *Clin Chem Lab Med.* 48, 1685-91.
- Bochud, P.Y., Glauser, M.P., Calandra, T., 2001. Antibiotics in sepsis. *Intensive Care Med.* 27 Suppl 1, S33-48.
- Bockamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F., Zabel, B., 2002. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics.* 11, 115-32.
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., Sibbald, W.J., 1992a. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 101, 1644-55.
- Bone, R.C., Sibbald, W.J., Sprung, C.L., 1992b. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest.* 101, 1481-3.
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., Sibbald, W.J., 2009. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest.* 136, e28.
- Bozza, F.A., Gomes, R.N., Japiassu, A.M., Soares, M., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., Bozza, M.T., 2004. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock.* 22, 309-13.
- Bozza, F.A., Bozza, P.T., Castro Faria Neto, H.C., 2005. Beyond sepsis pathophysiology with cytokines: what is their value as biomarkers for disease severity? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100 Suppl 1, 217-21.
- Bozza, M., Satoskar, A.R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A.A., Gerard, C., David, J.R., 1999. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med.* 189, 341-6.
- Bozza, P.T., Bakker-Abreu, I., Navarro-Xavier, R.A., Bandeira-Melo, C., 2011. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*
- Bozza, P.T., Bandeira-Melo, C., 2005. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100 Suppl 1, 113-20.
- Bozza, P.T., Melo, R.C., Bandeira-Melo, C., 2007. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* 113, 30-49.
- Bozza, P.T., Magalhaes, K.G., Weller, P.F., 2009. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1791, 540-51.
- Broad, A., Kirby, J.A., Jones, D.E., 2007. Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon-beta production. *Immunology.* 120, 103-11.
- Brown, D.A., 2001. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol.* 11, R446-9.

- Brun-Buisson, C., 2000. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 26 Suppl 1, S64-74.
- Buras, J.A., Holzmann, B., Sitkovsky, M., 2005. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 4, 854-65.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A., Bucala, R., 1994. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med.* 179, 1895-902.
- Cannon, C.P., Braunwald, E., McCabe, C.H., Rader, D.J., Rouleau, J.L., Belder, R., Joyal, S.V., Hill, K.A., Pfeffer, M.A., Skene, A.M., 2004. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 350, 1495-504.
- Carson, W.F., Cavassani, K.A., Dou, Y., Kunkel, S.L., 2011. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics.* 6, 273-83.
- Chaudhry, M.Z., Wang, J.H., Blankson, S., Redmond, H.P., 2008. Statin (cerivastatin) protects mice against sepsis-related death via reduced proinflammatory cytokines and enhanced bacterial clearance. *Surg Infect (Larchmt).* 9, 183-94.
- Chen, J.C., Huang, K.C., Wingerd, B., Wu, W.T., Lin, W.W., 2004. HMG-CoA reductase inhibitors induce COX-2 gene expression in murine macrophages: role of MAPK cascades and promoter elements for CREB and C/EBPbeta. *Exp Cell Res.* 301, 305-19.
- Cho, M.C., Lee, K., Paik, S.G., Yoon, D.Y., 2008. Peroxisome Proliferators-Activated Receptor (PPAR) Modulators and Metabolic Disorders. *PPAR Res.* 2008, 679137.
- Chua, D., Tsang, R.S., Kuo, I.F., 2007. The role of statin therapy in sepsis. *Ann Pharmacother.* 41, 647-52.
- Cobb, J.P., Hotchkiss, R.S., Swanson, P.E., Chang, K., Qiu, Y., Laubach, V.E., Karl, I.E., Buchman, T.G., 1999. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene deficiency increases the mortality of sepsis in mice. *Surgery.* 126, 438-42.
- Cohen, J., Guyatt, G., Bernard, G.R., Calandra, T., Cook, D., Elbourne, D., Marshall, J., Nunn, A., Opal, S., 2001. New strategies for clinical trials in patients with sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 29, 880-6.
- Cohen, J., 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 420, 885-91.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E., 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 29, 313-26.
- Dinarello, C.A., 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest.* 112, 321S-329S.
- Doi, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S., Star, R.A., 2009. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest.* 119, 2868-78.
- Donnino M, H.M., Cocchi M, Talmor D, Clardy P, Shapiro, N., 2007. Statin therapy in patients with sepsis. *Acad Emerg Med.* 14: S179.
- Durant, R., Klouche, K., Delbosc, S., Morena, M., Amigues, L., Beraud, J.J., Canaud, B., Cristol, J.P., 2004. Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin e and simvastatin. *Shock.* 22, 34-9.

- Dyson, A., Singer, M., 2009. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med.* 37, S30-7.
- Echtenacher, B., Urbaschek, R., Weigl, K., Freudenberg, M.A., Mannel, D.N., 2003. Treatment of experimental sepsis-induced immunoparalysis with TNF. *Immunobiology.* 208, 381-9.
- Eum, H.A., Park, S.W., Lee, S.M., 2007. Role of nitric oxide in the expression of hepatic vascular stress genes in response to sepsis. *Nitric Oxide.* 17, 126-33.
- Falagas, M.E., Makris, G.C., Matthaïou, D.K., Rafailidis, P.I., 2008. Statins for infection and sepsis: a systematic review of the clinical evidence. *J Antimicrob Chemother.* 61, 774-85.
- Gao, F., Linhartova, L., Johnston, A.M., Thickett, D.R., 2008. Statins and sepsis. *Br J Anaesth.* 100, 288-98.
- Gaur, U., Aggarwal, B.B., 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol.* 66, 1403-8.
- Geller, D.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Wang, S.C., Simmons, R.L., Billiar, T.R., 1993. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 522-6.
- Geroulanos, S., Douka, E.T., 2006. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med.* 32, 2077.
- Gogos, C.A., Drosou, E., Bassaris, H.P., Skoutelis, A., 2000. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis.* 181, 176-80.
- Goldsby RA, K.T., Osborne BA. , 2000. *Kuby Immunology*, Vol., W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343, 425-30.
- Gomes, R.N., Figueiredo, R.T., Bozza, F.A., Pacheco, P., Amancio, R.T., Laranjeira, A.P., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., Bozza, M.T., 2006. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock.* 26, 457-63.
- Gordon, A.C., Lagan, A.L., Aganna, E., Cheung, L., Peters, C.J., McDermott, M.F., Millo, J.L., Welsh, K.I., Holloway, P., Hitman, G.A., Piper, R.D., Garrard, C.S., Hinds, C.J., 2004. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. *Genes Immun.* 5, 631-40.
- Greenwood, J., Mason, J.C., 2007. Statins and the vascular endothelial inflammatory response. *Trends Immunol.* 28, 88-98.
- Guyton, K., Zingarelli, B., Ashton, S., Teti, G., Tempel, G., Reilly, C., Gilkeson, G., Halushka, P., Cook, J., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate macrophage activation by gram-negative and gram-positive bacterial stimuli. *Shock.* 20, 56-62.

- Hack, C.E., De Groot, E.R., Felt-Bersma, R.J., Nuijens, J.H., Strack Van Schijndel, R.J., Eerenberg-Belmer, A.J., Thijs, L.G., Aarden, L.A., 1989. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*. 74, 1704-10.
- Hauser, B., Bracht, H., Matejovic, M., Radermacher, P., Venkatesh, B., 2005. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg*. 101, 488-98.
- Hauser, B., Matejovic, M., Radermacher, P., 2008. Nitric oxide, leukocytes and microvascular permeability: causality or bystanders? *Crit Care*. 12, 104.
- Heemskerk, S., Pickkers, P., Bouw, M.P., Draisma, A., van der Hoeven, J.G., Peters, W.H., Smits, P., Russel, F.G., Masereeuw, R., 2006. Upregulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 1, 853-62.
- Hengst, J.M., 2003. The role of C-reactive protein in the evaluation and management of infants with suspected sepsis. *Adv Neonatal Care*. 3, 3-13.
- Hickey, M.J., Sihota, E., Amrani, A., Santamaria, P., Zbytniuk, L.D., Ng, E.S., Ho, W., Sharkey, K.A., Kubes, P., 2002. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in endotoxemia: chimeric mice reveal different cellular sources in various tissues. *FASEB J*. 16, 1141-3.
- Holly, M.K., Dear, J.W., Hu, X., Schechter, A.N., Gladwin, M.T., Hewitt, S.M., Yuen, P.S., Star, R.A., 2006. Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney Int*. 70, 496-506.
- Hopkins, N., Gunning, Y., O'Croinin, D.F., Laffey, J.G., McLoughlin, P., 2006. Anti-inflammatory effect of augmented nitric oxide production in chronic lung infection. *J Pathol*. 209, 198-205.
- Hotchkiss, R.S., Karl, I.E., 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 348, 138-50.
- Huhle, G., Abletshauser, C., Mayer, N., Weidinger, G., Harenberg, J., Heene, D.L., 1999. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thromb Res*. 95, 229-34.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., 2007. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*, Vol. Único, Artmed, Porto Alegre.
- Janeway, C.A., P. Travers, et al., 2007a. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*, Vol., Artmed Porto Alegre.
- Janeway, C.A.T., P.; Walport, M.; Shlomchick, M.J., 2007b. *Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença*. , Vol. 6, Artmed.
- Jasinska, M., Owczarek, J., Orszulak-Michalak, D., 2007. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep*. 59, 483-99.
- Jerwood, S., Cohen, J., 2008. Unexpected antimicrobial effect of statins. *J Antimicrob Chemother*. 61, 362-4.
- Johnson, M.M., Vaughn, B., Triggiani, M., Swan, D.D., Fonteh, A.N., Chilton, F.H., 1999. Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 21, 253-8.

- Kan, W., Zhao, K.S., Jiang, Y., Yan, W., Huang, Q., Wang, J., Qin, Q., Huang, X., Wang, S., 2004. Lung, spleen, and kidney are the major places for inducible nitric oxide synthase expression in endotoxic shock: role of p38 mitogen-activated protein kinase in signal transduction of inducible nitric oxide synthase expression. *Shock*. 21, 281-7.
- Klenzack, J., Himmelfarb, J., 2005. Sepsis and the kidney. *Crit Care Clin*. 21, 211-22.
- Kluger, M.J., Kozak, W., Leon, L.R., Conn, C.A., 1998. The use of knockout mice to understand the role of cytokines in fever. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 25, 141-4.
- Knowles, R.G., Merrett, M., Salter, M., Moncada, S., 1990. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J*. 270, 833-6.
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., Moilanen, E., 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 4, 471-9.
- Kouroumichakis, I., Papanas, N., Proikaki, S., Zarogoulidis, P., Maltezos, E., 2011. Statins in prevention and treatment of severe sepsis and septic shock. *Eur J Intern Med*. 22, 125-33.
- Kox, W.J., Volk, T., Kox, S.N., Volk, H.D., 2000. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med*. 26 Suppl 1, S124-8.
- Kumana, C.R., Cheung, B.M., Lauder, I.J., 2003. Simvastatin reduced mortality and vascular events in high-risk patients. *ACP J Club*. 138, 2-3.
- Laufs, U., Liao, J.K., 1998. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 273, 24266-71.
- Leaver, S.K., Finney, S.J., Burke-Gaffney, A., Evans, T.W., 2007. Sepsis since the discovery of Toll-like receptors: disease concepts and therapeutic opportunities. *Crit Care Med*. 35, 1404-10.
- LeMay, L.G., Vander, A.J., Kluger, M.J., 1990. Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol*. 258, R798-803.
- Leon, L.R., White, A.A., Kluger, M.J., 1998. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am J Physiol*. 275, R269-77.
- Li, Q., Verma, I.M., 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2, 725-34.
- Liu, S., Adcock, I.M., Old, R.W., Barnes, P.J., Evans, T.W., 1993. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 196, 1208-13.
- Lobo, S.M., Lobo, F.R.M., 2007. Markers and mediators of inflammatory response in infection and sepsis. *Rev. Bras. Ter. Intensiva*. 19, 210-215.
- Mackay, F., Loetscher, H., Stueber, D., Gehr, G., Lesslauer, W., 1993. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med*. 177, 1277-86.
- Marie, C., Pitton, C., Fitting, C., Cavaillon, J.M., 1996. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGFbeta) of interleukin-8 production by LPS- and/ or TNFalpha-activated human polymorphonuclear cells. *Mediators Inflamm*. 5, 334-40.

- Maron, D.J., Fazio, S., Linton, M.F., 2000. Current perspectives on statins. *Circulation*. 101, 207-13.
- Marshall, J.C., 2004. Sepsis: current status, future prospects. *Curr Opin Crit Care*. 10, 250-64.
- Matsukawa, A., Hogaboam, C.M., Lukacs, N.W., Lincoln, P.M., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., 1999. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol*. 163, 6148-54.
- Maynard, N.D., Bihari, D.J., Dalton, R.N., Beale, R., Smithies, M.N., Mason, R.C., 1997. Liver function and splanchnic ischemia in critically ill patients. *Chest*. 111, 180-7.
- McCall, T.B., Boughton-Smith, N.K., Palmer, R.M., Whittle, B.J., Moncada, S., 1989. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J*. 261, 293-6.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388, 394-7.
- Merx, M.W., Liehn, E.A., Janssens, U., Lutticken, R., Schrader, J., Hanrath, P., Weber, C., 2004. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis. *Circulation*. 109, 2560-5.
- Merx, M.W., Liehn, E.A., Graf, J., van de Sandt, A., Schaltenbrand, M., Schrader, J., Hanrath, P., Weber, C., 2005. Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation*. 112, 117-24.
- Methe, H., Kim, J.O., Kofler, S., Nabauer, M., Weis, M., 2005. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25, 1439-45.
- Micheau, O., Tschopp, J., 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 114, 181-90.
- Miyoshi, T., Yamashita, K., Arai, T., Yamamoto, K., Mizugishi, K., Uchiyama, T., 2010. The role of endothelial interleukin-8/NADPH oxidase 1 axis in sepsis. *Immunology*.
- Morikawa, S., Takabe, W., Mataka, C., Kanke, T., Itoh, T., Wada, Y., Izumi, A., Saito, Y., Hamakubo, T., Kodama, T., 2002. The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation, and vascular constriction in HUVEC. Human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 9, 178-83.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A., Loetscher, P., 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*. 25, 75-84.
- Mundel, P., Bachmann, S., Bader, M., Fischer, A., Kummer, W., Mayer, B., Kriz, W., 1992. Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int*. 42, 1017-9.
- Murakami, M., 2011. Lipid mediators in life science. *Exp Anim*. 60, 7-20.
- Murphy, D.J., 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*. 40, 325-438.
- Nava, E., Palmer, R.M., Moncada, S., 1991. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet*. 338, 1555-7.

- O'Brien, J.M., Jr., Ali, N.A., Abercgg, S.K., Abraham, E., 2007. Sepsis. *Am J Med.* 120, 1012-22.
- Ohlsson, K., Bjork, P., Bergenfeldt, M., Hageman, R., Thompson, R.C., 1990. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature.* 348, 550-2.
- Old, L.J., 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science.* 230, 630-2.
- Osler, S.W., 1921. *The Evolution of Modern Medicine, Vol.*, Yale University Press.
- Pacheco, P., Bozza, F.A., Gomes, R.N., Bozza, M., Weller, P.F., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol.* 169, 6498-506.
- Pastor, C.M., Billiar, T.R., Losser, M.R., Payen, D.M., 1995. Liver injury during sepsis. *J Crit Care.* 10, 183-97.
- Pene, F., Zuber, B., Courtine, E., Rousseau, C., Ouaz, F., Toubiana, J., Tazi, A., Mira, J.P., Chiche, J.D., 2008. Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. *J Immunol.* 181, 8513-20.
- Pinsky, M.R., Vincent, J.L., Deviere, J., Alegre, M., Kahn, R.J., Dupont, E., 1993. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest.* 103, 565-75.
- Prasad, R., Giri, S., Nath, N., Singh, I., Singh, A.K., 2005. Inhibition of phosphoinositide 3 kinase-Akt (protein kinase B)-nuclear factor-kappa B pathway by lovastatin limits endothelial-monocyte cell interaction. *J Neurochem.* 94, 204-14.
- Quartin, A.A., Schein, R.M., Kett, D.H., Peduzzi, P.N., 1997. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA.* 277, 1058-63.
- Ramnath, R.D., Ng, S.W., Guglielmotti, A., Bhatia, M., 2008. Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. *Int Immunopharmacol.* 8, 810-8.
- Ray, K.K., Cannon, C.P., 2004. Intensive statin therapy in acute coronary syndromes: clinical benefits and vascular biology. *Curr Opin Lipidol.* 15, 637-43.
- Remick, D.G., Newcomb, D.E., Bolgos, G.L., Call, D.R., 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock.* 13, 110-6.
- Remick, D.G., Ward, P.A., 2005. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock.* 24 Suppl 1, 7-11.
- Rezaie-Majd, A., Prager, G.W., Bucek, R.A., Scherthaner, G.H., Maca, T., Kress, H.G., Valent, P., Binder, B.R., Minar, E., Baghestanian, M., 2003. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23, 397-403.
- Riedemann, N.C., Guo, R.F., Ward, P.A., 2003a. A key role of C5a/C5aR activation for the development of sepsis. *J Leukoc Biol.* 74, 966-70.

- Riedemann, N.C., Neff, T.A., Guo, R.F., Bernacki, K.D., Laudes, I.J., Sarma, J.V., Lambris, J.D., Ward, P.A., 2003b. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol.* 170, 503-7.
- Rittirsch, D., Flierl, M.A., Ward, P.A., 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 8, 776-87.
- Roger, T., David, J., Glauser, M.P., Calandra, T., 2001a. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature.* 414, 920-4.
- Roger, T., Glauser, M.P., Calandra, T., 2001b. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *J Endotoxin Res.* 7, 456-60.
- Ruiz-Velasco, N., Dominguez, A., Vega, M.A., 2004. Statins upregulate CD36 expression in human monocytes, an effect strengthened when combined with PPAR-gamma ligands Putative contribution of Rho GTPases in statin-induced CD36 expression. *Biochem Pharmacol.* 67, 303-13.
- Russell, J.A., 2006. Management of sepsis. *N Engl J Med.* 355, 1699-713.
- Salgado Junior, W., Santos, J.S., Cunha Fde, Q., 2007. Development of a lethal model of peritonitis for assessment of laparoscopic and laparotomic treatments in rats. *Acta Cir Bras.* 22, 39-42.
- Sevransky, J.E., Shaked, G., Novogrodsky, A., Levitzki, A., Gazit, A., Hoffman, A., Elin, R.J., Quezado, Z.M., Freeman, B.D., Eichacker, P.Q., Danner, R.L., Banks, S.M., Bacher, J., Thomas, M.L., 3rd, Natanson, C., 1997. Tyrphostin AG 556 improves survival and reduces multiorgan failure in canine *Escherichia coli* peritonitis. *J Clin Invest.* 99, 1966-73.
- Silva, E., Pedro Mde, A., Sogayar, A.C., Mohovic, T., Silva, C.L., Janiszewski, M., Cal, R.G., de Sousa, E.F., Abe, T.P., de Andrade, J., de Matos, J.D., Rezende, E., Assuncao, M., Avezum, A., Rocha, P.C., de Matos, G.F., Bento, A.M., Correa, A.D., Vieira, P.C., Knobel, E., 2004. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 8, R251-60.
- Slotta, J.E., Laschke, M.W., Wang, Y., Schilling, M.K., Menger, M.D., Thorlacius, H., 2009. Inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase reduces leukocyte recruitment and hepatocyte apoptosis in endotoxin-induced liver injury. *J Investig Med.* 57, 645-9.
- Soubrier, S., Leroy, O., Devos, P., Nseir, S., Georges, H., d'Escrivan, T., Guery, B., 2006. Epidemiology and prognostic factors of critically ill patients treated with hemodiafiltration. *J Crit Care.* 21, 66-72.
- Souza Neto JL, A.F.I., Rego ACM, Dominici VA, Azevedo IM, Egito EST, Brandão-Neto J, Medeiros AC. , 2006. Effects of simvastatin in abdominal sepsis in rats. *Acta Cir Bras.*
- Speyer, C.L., Gao, H., Rancilio, N.J., Neff, T.A., Huffnagle, G.B., Sarma, J.V., Ward, P.A., 2004. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am J Pathol.* 165, 2187-96.
- Takemoto, M., Liao, J.K., 2001. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21, 1712-9.

- Tanaka, H., Ishikawa, K., Nishino, M., Shimazu, T., Yoshioka, T., 1996. Changes in granulocyte colony-stimulating factor concentration in patients with trauma and sepsis. *J Trauma*. 40, 718-25; discussion 725-6.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., Fujimoto, T., 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem*. 277, 44507-12.
- Terblanche, M., Almog, Y., Rosenson, R.S., Smith, T.S., Hackam, D.G., 2007. Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels. *Lancet Infect Dis*. 7, 358-68.
- Thomas, L., 1972. *Germes*. *N Engl J Med*. 287, 553-5.
- Tojo, A., Gross, S.S., Zhang, L., Tisher, C.C., Schmidt, H.H., Wilcox, C.S., Madsen, K.M., 1994. Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol*. 4, 1438-47.
- Trzeciak, S., Cinel, I., Phillip Dellinger, R., Shapiro, N.I., Arnold, R.C., Parrillo, J.E., Hollenberg, S.M., 2008. Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Acad Emerg Med*. 15, 399-413.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 20, 825-52.
- Utgaard, J.O., Jahnsen, F.L., Bakka, A., Brandtzaeg, P., Haraldsen, G., 1998. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med*. 188, 1751-6.
- van de Garde EM, H.E., Souverein PC, Hoes AW, van den, Bosch JM, L.H., 2006. Statin therapy and reduced risk of pneumonia in patients with diabetes. *Thorax*.
- Vermont, C.L., Hazelzet, J.A., de Kleijn, E.D., van den Dobbelsteen, G.P., de Groot, R., 2006. CC and CXC chemokine levels in children with meningococcal sepsis accurately predict mortality and disease severity. *Crit Care*. 10, R33.
- Vincent, J.L., Abraham, E., Annane, D., Bernard, G., Rivers, E., Van den Berghe, G., 2002a. Reducing mortality in sepsis: new directions. *Crit Care*. 6 Suppl 3, S1-18.
- Vincent, J.L., Sun, Q., Dubois, M.J., 2002b. Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. *Clin Infect Dis*. 34, 1084-93.
- von Knethen, A., Soller, M., Brune, B., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 55, 19-25.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 10, 45-65.
- Wakabayashi, G., Gelfand, J.A., Burke, J.F., Thompson, R.C., Dinarello, C.A., 1991. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents Escherichia coli-induced shock in rabbits. *FASEB J*. 5, 338-43.
- Weitz-Schmidt, G., Welzenbach, K., Brinkmann, V., Kamata, T., Kallen, J., Bruns, C., Cottens, S., Takada, Y., Hommel, U., 2001. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*. 7, 687-92.
- Weller, P.F., Ackerman, S.J., Nicholson-Weller, A., Dvorak, A.M., 1989. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol*. 135, 947-59.

- Weller, P.F., Ryeom, S.W., Picard, S.T., Ackerman, S.J., Dvorak, A.M., 1991. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 113, 137-46.
- Weller, P.F., Bozza, P.T., Yu, W., Dvorak, A.M., 1999. Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation. *Int Arch Allergy Immunol.* 118, 450-2.
- West, A.P., Koblansky, A.A., Ghosh, S., 2006. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22, 409-37.
- Wichterman, K.A., Baue, A.E., Chaudry, I.H., 1980. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 29, 189-201.
- Wilkins, W., 1972. In: *Stedman's Medical Dictionary*. Vol., Baltimore, ed. eds.
- Wink, D.A., Hines, H.B., Cheng, R.Y., Switzer, C.H., Flores-Santana, W., Vitek, M.P., Ridnour, L.A., Colton, C.A., 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol.* 89, 873-91.
- Yang, B.C., Mehta, P., Mehta, J.L., 1997. Nitric Oxide Synthesis Inhibition and Role of P-selectin in Leukocyte Adhesion to Vascular Tissues. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2, 107-114.
- Yang, M., Chen, P., 2008. [The manifestation of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 31, 564-5.
- Yang, W., Yamada, M., Tamura, Y., Chang, K., Mao, J., Zou, L., Feng, Y., Kida, K., Scherrer-Crosbie, M., Chao, W., Ichinose, F., Yu, Y.M., Fischman, A.J., Tompkins, R.G., Yao, S., Kaneki, M., 2010. Farnesyltransferase inhibitor, FTI-277, reduces mortality of septic mice along with improved bacterial clearance. *J Pharmacol Exp Ther.*
- Yasuda, H., Yuen, P.S., Hu, X., Zhou, H., Star, R.A., 2006. Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. *Kidney Int.* 69, 1535-42.
- Yoshida, M., Sawada, T., Ishii, H., Gerszten, R.E., Rosenzweig, A., Gimbrone, M.A., Jr., Yasukochi, Y., Numano, F., 2001. Hmg-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21, 1165-71.
- Yu, W., Bozza, P.T., Tzizik, D.M., Gray, J.P., Cassara, J., Dvorak, A.M., Weller, P.F., 1998. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol.* 152, 759-69.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K., Daum, G., 2000. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 1469, 101-20.