

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**HEME OXIGENASE-1 COMO UM ALVO TERAPÊUTICO NA SEPSE:
O PAPEL DA BILIVERDINA**

PEDRO MENDES DE AZAMBUJA RODRIGUES

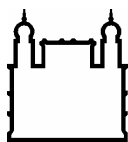
Rio de Janeiro

Agosto/2007

TESE MBCM -IOC

P.M.A. RODRIGUES

2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PEDRO MENDES DE AZAMBUJA RODRIGUES

Heme oxigenase-1 como um alvo terapêutico na sepse: o papel da biliverdina

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

Orientadores: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro-Faria-Neto
Prof. Dr. Aurélio Vicente Graça de Souza

RIO DE JANEIRO
2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FIOCRUZ - RJ

R696

Rodrigues, Pedro Mendes de Azambuja

Heme oxigenase-1 como um alvo terapêutico na sepse: o papel da biliverdina / Pedro Mendes de Azambuja. – Rio de Janeiro, 2007.

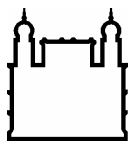
xiv, 93 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2007.

Bibliografia: f. 46-53

1. Biliverdina. 2. Sepse. 3. Heme Oxigenase-1 I. Título.

CDD 616.930



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PEDRO MENDES DE AZAMBUJA RODRIGUES

HEME OXIGENASE-1 COMO UM ALVO TERAPÊUTICO NA SEPSE: O PAPEL DA BILIVERDINA

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Hugo Caire de Castro-Faria-Neto
Prof. Dr. Aurélio Vicente Graça de Souza

Aprovada em: 11/08/2007

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro - IOC/FIOCRUZ (Presidente)

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza - IMPPG/UFRJ (Membro)

Prof. Dr. Otelo Rigato Junior - EPM/UNIFESP (Membro)

Profa. Dra. Adriana Ribeiro Silva - IOC/FIOCRUZ (Revisor/Suplente)

Prof. Dr. Marcus Fernandes de Oliveira - IBqM/UFRJ (Suplente)

*Aos meus pais, Paulo e Regina, e à Julia,
por todo o apoio e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Hugo Caire de Castro-Faria-Neto, por ter enxergado em mim um interesse genuíno pela ciência, permitindo que eu começasse a freqüentar o Laboratório de Imunofarmacologia. Por compartilhar comigo sua grande experiência, e pela confiança, orientação e oportunidades que propiciaram o meu crescimento como pesquisador.

Ao Dr. Aurélio Vicente Graça de Souza, pela orientação, incentivo e por ter aberto as portas do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, onde desenvolvi parte dos experimentos.

À Dra. Patrícia Torres Bozza pela ajuda, acessibilidade e por acreditar, junto ao Dr. Hugo, no valor de um ambiente multidisciplinar e na troca livre de idéias.

À Dra. Rachel Novaes Gomes, pela inestimável colaboração nos experimentos e pelas lições diárias não só da técnica como também da criatividade e perseverança necessárias para se desenvolver um projeto.

Ao Dr. Fernando Augusto Bozza pela grande colaboração em todas as fases do projeto e por servir como um exemplo de que é possível (e desejável) cruzar as barreiras entre a beira do leito e a bancada.

À Dra. Heloisa D`ávila pela contribuição nos experimentos de dosagem de citocinas.

À Michelle Gomes e Mariana pela ajuda nos experimentos de CLP.

À Kathleen pela ajuda no experimento de Western Blotting.

À Dra. Adriana Ribeiro Silva, pela revisão deste manuscrito.

Aos demais integrantes do Grupo Sepse: André Japiassú, Rodrigo Amâncio, Daniele Nascimento, Renata Carnevale e Eduardo Lami, pela fonte constante de inspiração e idéias.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Imunofarmacologia, pelo convívio e ajuda que tornaram o desenvolvimento deste projeto uma tarefa muito mais fácil e prazerosa: Bárbara D'alegria, Dra. Patrícia Pacheco, Dra. Clarissa Maya Monteiro, Dra. Adriana Vieira, Dr. Válber Frutuoso, Andressa, Cassiano, Zanon, Surrage, Fabio, Líliane, Patrícia Elaine, Dra. Patrícia Reis, Rafael, Kelly, Alessandra, Diogo, Daiane, Clarissa e Nathalia.

À Rose Branco, elemento fundamental no laboratório pela sua competência e personalidade.

Aos bioteristas do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Nelson, Edson e Ubiratan, pelo cuidado dos animais.

Às agências de fomento, FAPERJ, CNPq e FIOCRUZ, pelo suporte financeiro.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Páginas
Tabela 1.1 Definições de sepse e de suas conseqüências.....	2
Figura 1.1 Vias de sinalização do Toll.....	4
Figura 1.2 Degradação enzimática do heme pela heme oxigenase, gerando biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro (Fe ²⁺).....	8
Figura 4.1 Efeitos da inibição da HO-1 sobre a mortalidade induzida pela CLP.....	21
Figura 4.2 Efeitos da indução da HO-1 sobre a mortalidade induzida pela CLP.....	22
Figura 4.3 Indução da HO-1 pela CoPP.....	23
Figura 4.4 Efeito da biliverdina sobre a mortalidade induzida pela endotoxemia.....	25
Figura 4.5 Efeito da biliverdina sobre a mortalidade induzida pela CLP: 3 doses i.p.	26
Figura 4.6 Efeito da biliverdina sobre a mortalidade induzida pela CLP: 3 doses s.c.	27
Figura 4.7 Efeito da biliverdina sobre a mortalidade induzida pela CLP: pós-tratamento.....	28
Figura 4.8 Efeito do tratamento com a biliverdina sobre o acúmulo de leucócitos no lavado peritoneal após a CLP.....	30
Figura 4.9 Efeito do tratamento com a biliverdina sobre o nível de citocinas no lavado peritoneal após a CLP.....	31
Figura 4.10 Efeito do tratamento com a biliverdina sobre o número de UFC no lavado peritoneal após a CLP.....	33
Figura 4.11 Efeito direto da biliverdina sobre o crescimento bacteriano.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALT - Alanina aminotransferase (*alanine aminotransferase*)
- AP-1 – Proteína ativadora-1 (*activator protein-1*)
- AST - Aspartato aminotransferase (*aspartate aminotransferase*)
- BAL – Lavado brocoalveolar (*Bronchoalveolar lavage*)
- BVR - Biliverdina redutase (*biliverdin reductase*)
- CARS – Síndrome da resposta antiinflamatória compensatória (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*)
- cav. – Cavidade
- CD - Grupo de diferenciação (*cluster differentiation*)
- CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CLP - Ligadura e punção cecal (*cecal ligation and puncture*)
- CLR – Receptor de lectina tipo c (*c-type lectin receptor*)
- CoPP – Cobalto protoporfirina
- CORM – Molécula liberadora de CO (*CO-releasing molecule*)
- CpG- Guanina-fosforotioato-citosina (*cytosine-phosphorothioate-guanine*)
- DNA – Ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*)
- EPM – Erro padrão da média
- Ex. - Exemplo
- G-CSF- Fator estimulador de colônias de granulócitos (*granulocyte-colony-stimulating factor*)
- h – hora
- HMGB-1- Proteína do grupo de alta mobilidade box 1 (*high mobility group box 1*)
- i.p- Intraperitoneal
- HO – Heme oxigenase
- ICAM-1 – molécula de adesão intercelular (*intercellular adhesion molecule*)
- IFN- γ – Interferon gama (Interferon gamma)
- IRF3 – Fator regulador de interferon 3 (*Interferon regulatory factor 3*)
- I κ B- subunidade inibitória kappa B (Inhibitory kappa B)

IL-() – Interleucina
iNOS – Óxido nítrico sintase indutível (*inducible nitric oxide synthase*)
IRAK- proteína quinase associada ao receptor da IL-1 (*interleukin receptor-associated kinase-1*)
KC - Quimiocina derivada de queratinócitos (*keratinocyte-derived chemokine*)
LBP - Proteína ligadora de LPS (*LPS binding protein*)
LDH - desidrogenase láctica (*lactic dehydrogenase*)
LDL - Lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein*)
LPO - Lipoperoxidação
LPS - Lipopolissacarídeo
MAP - Proteína ativada de mitógeno (*mitogen-activated protein*)
MCP-1 - Proteína quimiotática para monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*)
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)
MIF - Fator inibidor da migração de macrófagos (*macrophage migration inhibitory factor*)
MyD-88 - Fator de diferenciação mielóide 88 (*myeloid differentiation factor 88*)
NADPH - nicotina-adenina dinucleotídeo fosfato (*nicotine adenine dinucleotide phosphate*)
NF- κ B - Fator nuclear κ -B (*nuclear factor κ -B*)
NLR - Receptor do tipo NOD (*NOD-like receptor*)
NOD - Domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo (*nucleotide-binding oligomerization domain*)
PAF - Fator de ativação plaquetária (*platelet-activating factor*)
PAGE - Eletroforese em gel de poliácridamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)
PBS - Solução de fosfato tamponada (*Phosphate buffered saline*)
PIRO - Predisposição, insulto/infecção, resposta, disfunção orgânica (*predisposition, insult/infection, response, organ disfunction*)
PMSF - Fenil-metil-sulfonil fluoreto (*Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride*)
PRR- Receptor de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptor*)
s.c. – Subcutâneo
SARA – Síndrome da angústia respiratória aguda
SDS - dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
SIRS - Síndrome de resposta inflamatória sistêmica (*systemic inflammatory response syndrome*)
SnPP - Estanho protoporfirina
TAT - *Trans*-ativador transcricional
TGF- β - Fator transformador do crescimento- β (*Transforming growth factor- β*)

Th - T auxiliar (*T helper*)

TIR - receptor Toll/IL-1 (*Toll/IL-1 receptor*)

TLR - receptor do tipo “toll” (*Toll-like receptor*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α (*Tumor necrosis factor- α*)

TNM - Tumor, linfonodo, metástase (*Tumor, node, metastasis*)

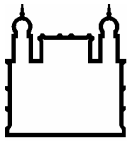
TRAF-6 - Fator associado com o receptor do TNF (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*)

TRIF – domínio do TIR contendo adaptador indutor de interferon (*TIR domain-containing adapter inducing interferon*)

UDP – Uridina difosfato (*uridine diphosphate*)

UFC – Unidade Formadora de Colônia (*colony-forming unit*)

UTI – Unidade de terapia intensiva



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

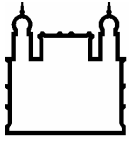
HEME OXIGENASE-1 COMO UM ALVO TERAPÊUTICO NA SEPSE: O PAPEL DA BILIVERDINA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Pedro Mendes de Azambuja Rodrigues

A heme oxigenase-1 (HO-1), uma enzima induzida sob diversas condições de estresse celular, cataboliza o heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (convertida posteriormente a bilirrubina) e ferro livre. A deficiência dessa enzima resulta em inflamação crônica e morte prematura. Por outro lado, o aumento da HO-1 e de seus produtos resulta em efeitos antiinflamatórios e antioxidantes. As injúrias inflamatória e oxidativa desempenham um papel importante na fisiopatologia da sepse. Nesse contexto, a HO-1 vem sendo caracterizada como um gene protetor. Recentemente, estudos demonstraram que a indução farmacológica da HO-1 ou a terapia com o CO e a biliverdina, isoladamente ou em associação, são capazes de diminuir a disfunção orgânica e a mortalidade em modelos animais de endotoxemia letal. Nossa proposta foi estudar o efeito da modulação da HO-1 e do tratamento com a biliverdina em um modelo mais clinicamente relevante de sepse, a ligadura e perfuração cecal (CLP). Nossos resultados apontam para um efeito benéfico da HO-1 no tratamento da sepse. Demonstramos que o tratamento com a estanho protoporfirina (SnPP), um supressor da HO-1, aumenta a mortalidade da CLP. Já nos animais tratados com a cobalto protoporfirina (CoPP), um indutor da HO-1, há um aumento da sobrevivência. O tratamento com a biliverdina também teve um impacto significativo, tanto em um modelo de endotoxemia letal como no modelo de CLP, reduzindo a mortalidade em aproximadamente 60% e 40%, respectivamente. Esse efeito protetor da biliverdina na CLP foi associado a uma modulação da resposta inflamatória, constatada pela redução do acúmulo de leucócitos e dos níveis de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, KC e IL-10) na cavidade peritoneal. Ao mesmo tempo, os animais tratados com a biliverdina apresentaram um decréscimo no número de unidades formadoras de colônias no lavado peritoneal, sugerindo um melhor controle local da infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HEME OXIGENASE-1 COMO UM ALVO TERAPÊUTICO NA SEPSE: O PAPEL DA BILIVERDINA

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Pedro Mendes de Azambuja Rodrigues

Heme oxygenase-1 (HO-1), an enzyme induced under various situations of cellular stress, catabolyses heme into carbon monoxide (CO), biliverdin (subsequently converted to bilirubin) and free iron. The deficiency of this enzyme results in chronic inflammation and premature death. On the other hand, an increase in HO-1 and its products results in anti-inflammatory and antioxidant effects. Inflammatory and oxidative injuries play an important role in sepsis pathophysiology. In this context, HO-1 has been characterized as a protective gene. Recently, studies have shown that the induction of HO-1 or therapy with CO and biliverdin, isolated or in association, is capable of reducing organ dysfunction and mortality in animal models of lethal endotoxemia. Our goal was to study the effects of the modulation of HO-1 and the treatment with biliverdin in a more clinically relevant model of sepsis, the cecal ligation and puncture (CLP) model. Our results suggest a beneficial effect of HO-1 in sepsis treatment. We demonstrated that the treatment with tin protoporphyrin (SnPP), a suppressor of HO-1, increases CLP mortality. On the other hand, animals treated with cobalt protoporphyrin (CoPP), an inducer of HO-1, had an increased survival. Treatment with biliverdin also had a significant impact over both lethal endotoxemia and CLP, reducing mortality in approximately 60% and 40%, respectively. This protective effect of biliverdin on CLP was associated with a modulation of the inflammatory response, observed by the reduction of leukocyte accumulation and levels of inflammatory mediators (TNF, IL-6, KC and IL-10) in the peritoneal cavity. At the same time, the animals treated with biliverdin had decreased numbers of colony-forming units in the peritoneal lavage fluid, suggesting a better local control of infection.

ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Fisiopatologia da sepse.....	03
1.2 Heme oxigenase-1.....	07
1.2.1 O heme e sua degradação enzimática.....	07
1.2.2 Biliverdina, bilirrubina e biliverdina redutase.....	09
1.2.3 Monóxido de carbono.....	10
1.2.4 Ferro e ferritina.....	10
1.2.5 Heme oxigenase-1 e doenças.....	10
1.2.6 Heme oxigenase-1 e SIRS/sepse.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Parecer do comitê de ética animal.....	16
3.2 Animais.....	16
3.3 Endotoxemia.....	16
3.4 Laparotomia seguida de ligadura e perfuração cecal (CLP).....	16
3.5 Tratamentos.....	17
3.6 Coleta de lavado peritoneal, fígado, coração e pulmões.....	17
3.7 Contagem das células do lavado peritoneal.....	17
3.8 Dosagem de citocinas.....	18
3.9 Incubação de bactérias em solução de biliverdina.....	18
3.10 Determinação de UFC.....	18
3.11 Western blotting para HO-1.....	19
3.12 Análises estatísticas.....	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1 A modulação da HO-1 altera a mortalidade da sepse induzida por CLP.....	10
4.2 A biliverdina protege contra a endotoxemia letal.....	24
4.3 A biliverdina protege contra a sepse induzida por CLP	24
4.4 A biliverdina reduz o acúmulo de leucócitos no peritônio após a CLP	29
4.5 A biliverdina modula o acúmulo de mediadores inflamatórios no peritônio	

após a CLP.....	29
4.6 A biliverdina aumenta a eliminação de bactérias no peritônio após a CLP.....	32
4.7 A biliverdina não possui efeito direto sobre o crescimento bacteriano.....	32
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
8. ANEXO (Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais).....	54
9. ANEXO (Produção Bibliográfica).....	56

1- INTRODUÇÃO

A Sepsis pode ser definida como o distúrbio da homeostase do organismo deflagrado por uma resposta inflamatória inadequada que se segue à infecção. Esse distúrbio se manifesta clinicamente como disfunção de órgãos, que, dependendo de sua magnitude, pode ser reversível ou levar à morte. Assim, a sepsis representa um desvio patológico de processos normalmente benéficos e necessários à sobrevivência (Cohen, 2002).

O conceito de que a resposta inflamatória pode, por si só, ser a causa de morbidade não é recente. Há mais de dois séculos atrás o cirurgião escocês John Hunter já escrevia: “*Inflammation is not itself considered to be a disease but a salutary operation... but when it cannot accomplish that salutary purpose... it does mischief.*” [(Hunter, 1794) apud (Marino, 1998)]. Relatos médicos de disfunção orgânica associada ao trauma remontam à época da segunda guerra mundial (Bywaters, 1990). O próprio termo “sepsis” teve origem na Grécia antiga, onde era usado para descrever o processo de putrefação e degradação tecidual que levava à doença e morte (Geroulanos and Douka, 2006). No entanto, a correlação entre esses fenômenos só foi estabelecida de forma mais clara no final do século XX.

As descrições de uma síndrome de falência múltipla de órgãos, que seria a manifestação de um processo sistêmico presente em pacientes com infecções ou hemorragia maciça, e posteriormente de uma “síndrome séptica”, serviram como base para a conferência de consenso organizada em 1991 pelo *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine*, onde foram definidos critérios para o diagnóstico da sepsis e suas conseqüências (Bone, et al., 1992; Bone, et al., 1989; Tilney, et al., 1973). Assim, o termo *síndrome da resposta inflamatória sistêmica* (SIRS) passa a descrever uma entidade clínica de causas variadas, como o trauma, pancreatite, ou infecção. A SIRS provocada por infecção é denominada *sepsis* e, dependendo do surgimento de hipoperfusão, choque circulatório ou disfunções orgânicas, pode ser subdividida em *sepsis grave*, *choque séptico* ou, finalmente, a *síndrome da disfunção orgânica múltipla* (MODS), que representa o extremo mais grave do espectro de evolução da SIRS (Tabela 1.1). Assim, pela primeira vez, surgem definições objetivas e amplamente aceitas ao redor do mundo para a sepsis. Posteriormente sugeriu-se que seria possível descrever além da SIRS uma *síndrome da resposta antiinflamatória compensatória* (CARS), resultado da imunossupressão que pode ser observada em subgrupos de pacientes sépticos, mas essa síndrome ainda não foi adotada na prática clínica da grande maioria das UTIs (Bone, 1996).

Tabela 1.1- Definições de sepse e de suas conseqüências (Bone, *et al.*, 1992).

Infecção

Fenômeno caracterizado por uma resposta inflamatória à presença de microrganismos ou à invasão de tecidos do hospedeiro normalmente estéreis, por estes organismos.

Bacteremia

Presença de bactérias viáveis no sangue evidenciada por hemocultura positiva.

Septicemia

Presença de microrganismos ou suas toxinas no sangue. Segundo o consenso este termo deve ser abandonado.

SIRS

Síndrome da resposta inflamatória sistêmica caracterizada por duas ou mais das seguintes condições:

Febre (temperatura corporal >38 °C), ou hipotermia (temperatura corporal <36 °C).

Taquipnéia (FR >20 ipm), ou hiperventilação (PaCO₂ <32 mm Hg).

Taquicardia (Frequência cardíaca >90 bpm).

Leucocitose (Leucometria total >12000/cu mm), ou leucopenia (Leucometria total <4000/cu mm), ou presença de neutrófilos imaturos (“bastões”) >10% do total.

Pode ter uma etiologia não infecciosa.

Sepse

Evidência clínica sugestiva de infecção, mais SIRS caracterizada por mais de dois dos sinais de resposta sistêmica à infecção.

Febre (temperatura corporal >38 °C), ou hipotermia (temperatura corporal <36 °C).

Taquipnéia (FR >20 ipm), ou hiperventilação (PaCO₂ <32 mm Hg).

Taquicardia (Frequência cardíaca >90 bpm).

Leucocitose (Leucometria total >12000/cu mm), ou leucopenia (Leucometria total <4000/cu mm), ou presença de neutrófilos imaturos (“bastões”) >10% do total.

Hemoculturas positivas não são necessárias.

Sepse Grave

Sepse com um ou mais sinal de disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão associada à sepse, tais como:

Hipoxemia (PaO₂/FiO₂ <280).

Aumento do lactato plasmático (acima do limite normal superior).

Oligúria (<0,5 ml/kg/h).

Alteração do estado de consciência.

Hipotensão Associada à Sepse

Diagnóstico clínico de sepse mais hipotensão (<90 mmHg ou queda maior ou igual a 40 mmHg abaixo do basal) por menos de 1h e responsiva à reposição volêmica.

Choque Séptico

Diagnóstico clínico de sepse grave mais hipotensão (<90 mmHg ou queda maior ou igual a 40 mmHg dos valores habituais de pressão) por pelo menos 1h e não responsivo a reposição volêmica.

Síndrome de Disfunção Orgânica Múltipla

É a presença de alterações da função orgânica em pacientes críticos, de forma que a homeostase sistêmica não possa ser mantida sem intervenções.

Síndrome Séptica

Diagnóstico clínico de sepse com evidências de alterações de perfusão em um ou mais sistemas. Segundo o consenso este termo também deveria ser abandonado

O estabelecimento desses critérios permitiu o estudo epidemiológico mais preciso do problema representado pela sepse. Em uma análise retrospectiva de 6.621.559 internações no ano de 1995 em 847 hospitais nos EUA, foram identificados 192.980 casos de sepse grave, o que levou a uma estimativa de 751.000 casos novos de sepse por ano naquele país, gerando custos anuais de aproximadamente 17 bilhões de dólares. A mortalidade hospitalar geral foi de 28,4%, subindo para 34,1% no subgrupo de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (Angus, *et al.*, 2001). No Brasil, o estudo mais abrangente publicado até o momento avaliou prospectivamente as internações realizadas em 65 UTIs durante o período de um mês no ano de 2003. Dos 3128 pacientes incluídos no estudo, 521 (16,7%) receberam diagnóstico de sepse, sepse grave ou choque séptico, com mortalidades em 28 dias de 16,7%, 34,4% e 65,3%, respectivamente (Sales Jr, *et al.*, 2006).

Apesar de sua contribuição para o progresso da pesquisa e compreensão da sepse, as limitações dos critérios de 1991 foram se tornando evidentes ao longo dos anos. Em 2001 foi organizado um encontro de sociedades médicas com o objetivo de reavaliar esses critérios, concluindo-se que, apesar de ainda serem conceitualmente relevantes, possuem baixa especificidade. Assim, agrupam populações muito heterogêneas, não permitindo o adequado estadiamento e determinação do prognóstico dos pacientes. Uma solução apontada para o problema foi o sistema PIRO (*predisposition, insult, response, organ dysfunction*), um modelo que procura estratificar os pacientes sépticos de acordo com fatores de predisposição, tipo de insulto deflagrador do processo, características da resposta do hospedeiro e disfunções orgânicas. Espera-se que com o desenvolvimento desse modelo possa-se identificar subgrupos de pacientes que evoluam de forma semelhante e respondam a determinadas terapias, analogamente ao que ocorre hoje com o sistema TNM (*tumor, node, metastasis*) de estadiamento do câncer (Levy, *et al.*, 2003).

1.1- Fisiopatologia da sepse

A resposta imediata ao estímulo infeccioso depende do reconhecimento de patógenos pelos componentes efetores da imunidade inata, como os fagócitos e a via alternativa do sistema complemento. Esse reconhecimento se dá através dos PRRs (*pattern recognition receptors*), receptores capazes de identificar estruturas altamente conservadas associadas a grupos de microorganismos. Um exemplo clássico é a resposta ao lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas. O LPS inicialmente é capturado por uma proteína plasmática, a LBP (*LPS binding protein*) e em seguida reconhecido pelo *toll-like*

receptor 4 (TLR4) presente na membrana celular, com o auxílio do receptor CD14 e da proteína MD-2. Os TLRs são uma família de pelo menos 12 receptores transmembranares cujo ectodomínio é capaz de reconhecer determinados padrões moleculares presentes no ambiente extracelular ou no interior de endossomos, e através do seu domínio citoplasmático, ativar vias de sinalização que culminam na expressão de genes. Assim, a transdução do sinal iniciado pela interação entre o LPS e o TLR4 resulta na ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), que modula a expressão de genes envolvidos na inflamação (Kawai and Akira, 2006) (Figura 1.1).

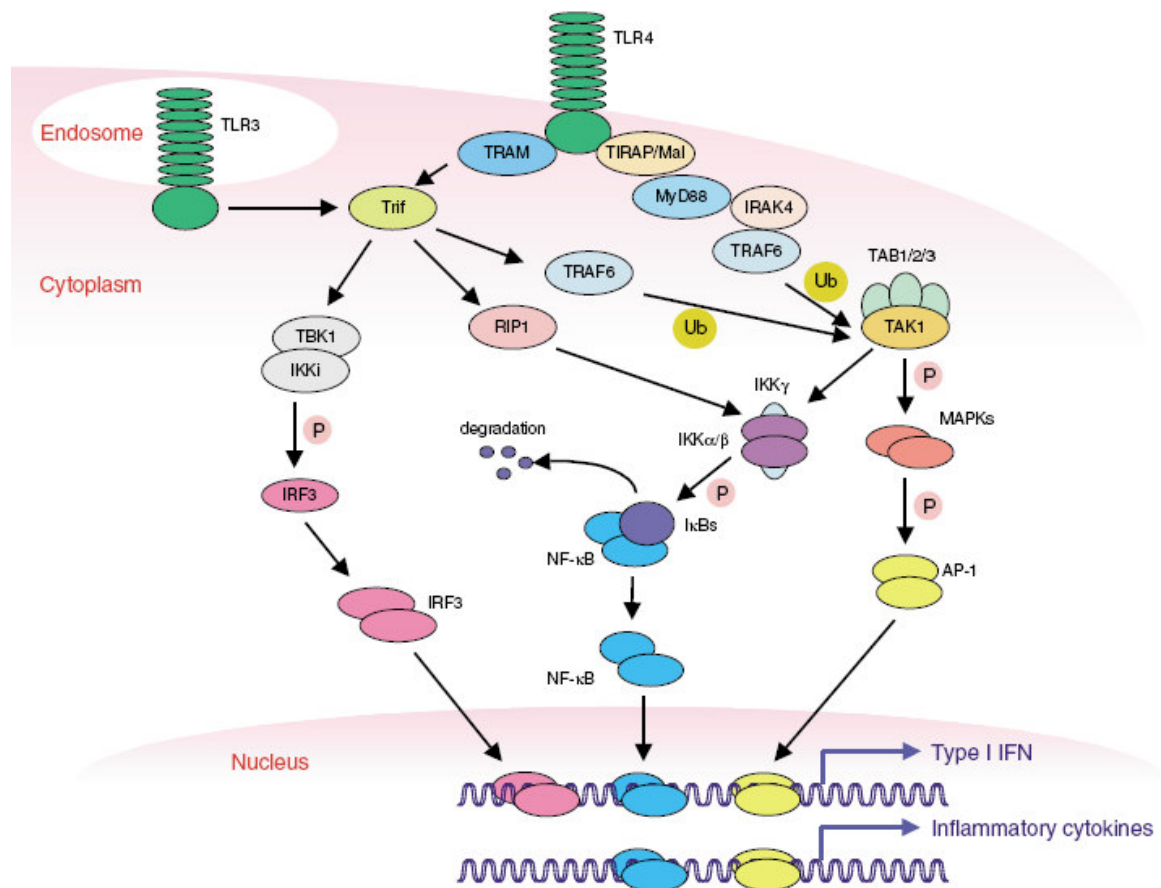


Figura 1.1 - Vias de sinalização do Toll: A sinalização dos TLRs depende de vários componentes, incluindo as proteínas adaptadoras MyD88 (*myeloid differentiation factor*) e TRIF (*TIR domain-containing adapter inducing interferon*). Várias etapas de fosforilação ocorrem em seqüência, culminando na ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B, IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) e AP-1 (*activator protein-1*) que se deslocam até o núcleo e induzem a expressão de genes inflamatórios. Reproduzido de (Kawai and Akira, 2006).

O resultado final desse processo é uma cascata de eventos que envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias – ex.: TNF- α (*Tumor necrosis factor- α*), IL-1, HMGB-1 (*high mobility group box 1*), MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) - e antiinflamatórias – ex.: IL-10, TGF- β (*Transforming growth factor- β*) - , assim como mediadores não protéicos – ex.: PAF (*platelet-activating factor*) e NO -, moléculas de adesão e sinalização da superfície celular - como ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) e fator tecidual -, proteínas de fase aguda e hormônios que agem de forma a coordenar a resposta imune em diversos órgãos e tecidos (Cohen, 2002).

Outros ligantes dos TLRs incluem DNA bacteriano (TLR9), componentes da parede celular de fungos (zimozan – TLR2) e bactérias Gram-positivas (ácido lipoteicóico e peptideoglicana - TLR2). Um crescente número de PRR não pertencentes à família dos TLRs vem sendo descritos, incluindo receptores localizados na superfície celular, como os CLR (*C-type lectin receptors*) ou citoplasmáticos, como a família dos NLRs (*nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*), composta por pelo menos 23 membros (Trinchieri and Sher, 2007).

A cooperação entre as vias de sinalização dos PRRs, bem como a sua expressão diferencial em órgãos e tecidos, tornam a resposta do hospedeiro mais complexa e variável do que sugerido pela Figura 1.1. Em conjunto, esses receptores atuam como uma rede sensorial que percebe a presença de microorganismos, e cujo padrão de ativação combinada é determinante na natureza das respostas subseqüentes (Trinchieri and Sher, 2007). Os estímulos capazes de induzir a inflamação, no entanto, não se restringem a produtos microbianos ou moléculas estranhas ao organismo, incorporando também moléculas endógenas liberadas em situações de estresse e dano tecidual, que podem funcionar como sinais de alerta para o sistema imune (Beutler, 2004; Gallucci and Matzinger, 2001).

O controle local da infecção é possível através de um delicado equilíbrio entre fatores pró e antiinflamatórios. Um evento fundamental para o desenvolvimento da sepse parece ser a amplificação e perda do direcionamento da resposta inflamatória, que assume um caráter sistêmico (Cohen, 2002). Esse conceito encontra respaldo em modelos experimentais, onde, por exemplo, a administração LPS provoca uma síndrome semelhante à sepse, que pode ser bloqueada através do uso de antiinflamatórios ou de anticorpos capazes de neutralizar citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 (Remick and Ward, 2005). Em humanos com sepse, o aumento de níveis circulantes de TNF- α ou IL-6 assim como polimorfismos nos genes de TNF- α e TLR4 estão associados ao desenvolvimento de disfunção orgânica e a um pior prognóstico

(Villar, *et al.*, 2004). No entanto, com o avanço do entendimento da fisiopatologia da sepse, torna-se cada vez mais evidente que o conceito de “hiperinflamação” não engloba todo o espectro de respostas observadas em pacientes sépticos. De fato, em alguns casos o desequilíbrio imunológico observado é a imunossupressão ou imunoparalisia, que podem tanto ocorrer primariamente como em sucessão a um estágio pró-inflamatório. Alguns mecanismos propostos para esse fenômeno são a redução da expressão de MHC classe II por macrófagos, a apoptose de células do sistema imune (como linfócitos B, linfócitos T CD4 e células dendríticas) e uma mudança do padrão de resposta Th1 para Th2 (Hotchkiss and Karl, 2003; Oberholzer, *et al.*, 2001).

Apesar da relação entre uma resposta inflamatória desregulada e o desenvolvimento da sepse ser evidente, o mecanismo através do qual a falência orgânica se estabelece ainda permanece em grande parte obscuro. Existem fortes indícios de que uma disfunção microcirculatória se desenvolve nos pacientes com sepse. As células endoteliais respondem à inflamação sistêmica com alterações fenotípicas que incluem um aumento da expressão de moléculas de adesão, fator tecidual e substâncias vasoativas. Esse processo favorece a ligação e ativação de neutrófilos, a ativação da cascata de coagulação e a alterações no fluxo sanguíneo regional, o que pode gerar lesão endotelial, trombose e desvios (“*shunts*”) na microcirculação. O reflexo desses distúrbios microcirculatórios é um déficit na perfusão e tecidual, o que provocaria o surgimento da disfunção dos tecidos e órgãos acometidos (Ince, 2005; Vallet, 2003).

Paradoxalmente, entretanto, o grau de lesão isquêmica dos órgãos observado na necrópsia de pacientes sépticos não parece justificar o déficit funcional apresentado (Hotchkiss, *et al.*, 1999). De fato, alguns estudos demonstraram que na sepse há uma queda do consumo de oxigênio nos tecidos, mesmo na presença de uma oferta de oxigênio adequada (Hayes, *et al.*, 1997; VanderMeer, *et al.*, 1995). Assim, uma falência bioenergética celular se estabeleceria em algum ponto da evolução da sepse, provocando disfunção orgânica independentemente da perfusão tecidual (Singer, *et al.*, 2004). Um desacoplamento na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial provocado por radicais livres e óxido nítrico pode ser responsável por esse fenômeno (Brealey, *et al.*, 2002). Finalmente, é um grande desafio estabelecer se esses achados são a causa primária da falência orgânica ou apenas epifenômenos que acompanham a evolução do paciente gravemente acometido.

1.2- Heme oxigenase-1

A lesão celular provocada pela inflamação e pelo estresse oxidativo parece desempenhar um papel central em diversos processos patológicos, dentre eles a sepse. As células, em contrapartida, possuem uma série de “genes protetores” cuja expressão objetiva a preservação da estrutura e função celulares em ambientes nocivos. Um desses genes é o que codifica a heme oxigenase-1 (HO-1), uma enzima que degrada a molécula de heme, produzindo monóxido de carbono (CO), biliverdina e ferro livre. A HO-1 e seus produtos vêm sendo alvo de intensa pesquisa, por suas notáveis propriedades biológicas e potencial como alvo terapêutico, que detalharemos a seguir.

1.2.1- O heme e sua degradação enzimática

O heme é uma molécula constituída por uma estrutura anelar complexa, a protoporfirina IX, contendo no seu centro um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}). Atuando como grupo prostético das hemeproteínas, o heme está envolvido em processos biológicos como o transporte de oxigênio (hemoglobina), respiração celular (citocromos), transdução de sinal (guanilato ciclase) e detoxificação de drogas (citocromo p450) (Ponka, 1999).

Apesar de sua importância fisiológica, o acúmulo excessivo de heme livre (dissociado de proteínas) pode ser nocivo para o organismo, por sua capacidade de gerar estresse oxidativo e lesar diretamente membranas lipídicas e organelas celulares (Knight, *et al.*, 2004). Como um reflexo de sua citotoxicidade e por atuar diretamente como um sinal endógeno de alerta para o sistema imune, o heme livre é um potente estímulo deflagrador de processos inflamatórios (Figueiredo, 2000; Graca-Souza, *et al.*, 2002). Portanto, uma série de mecanismos foi desenvolvida para impedir ou minimizar esses efeitos tóxicos. Assim, em mamíferos, o heme livre na circulação liga-se a proteínas plasmáticas como a haptoglobina e a albumina, o que reduz sua reatividade, facilitando seu transporte e captação pelas células (Knight, *et al.*, 2004). No ambiente intracelular, o principal mecanismo de detoxificação do heme é a sua degradação pela enzima microsomal heme oxigenase. Essa reação se dá pela quebra do anel porfirínico do heme, gerando quantidades equimolares de biliverdina, monóxido de carbono e ferro (Beale and Yeh, 1999) (Figura 1.2).

Até o momento existem duas isoformas bem caracterizadas de heme oxigenase (HO-1 e HO-2). Enquanto a HO-2 é expressa de forma constitutiva, a expressão da HO-1 é muito baixa ou indetectável na maioria das células em condições fisiológicas. No entanto a HO-1 é altamente indutível por estímulos potencialmente nocivos para as células, que incluem o heme, choque

térmico, peróxido de hidrogênio, endotoxina, luz ultravioleta e metais pesados, dentre outros (Wagener, *et al.*, 2003). A região promotora do gene da HO-1 possui sítios de ligação para fatores de transcrição envolvidos na resposta a situações de estresse celular como o NF- κ B e AP-1 *activator protein-1* (Lavrovsky, *et al.*, 1994). A indução da HO-1, por sua vez, é capaz de conferir citoproteção nessas situações através de efeitos antiinflamatórios, antioxidativos e antiapoptóticos (Otterbein, Soares, *et al.*, 2003). A deficiência de HO-1, tanto em um modelo animal como no primeiro caso humano descrito, resultou em inflamação crônica e morte prematura, caracterizando a importância desta enzima para a sobrevivência do organismo (Poss and Tonegawa, 1997; Yachie, *et al.*, 1999). Essa grande variedade de indutores e efeitos caracteriza a HO-1 como uma proteína de resposta ao estresse celular cuja importância transcende a sua capacidade de livrar o ambiente do heme livre. A ação da HO-1 parece ser mediada, ao menos em parte, pelos efeitos dos seus produtos biliverdina e CO, tradicionalmente vistos como desprovidos de atividade fisiológica relevante (Otterbein, Soares, *et al.*, 2003).

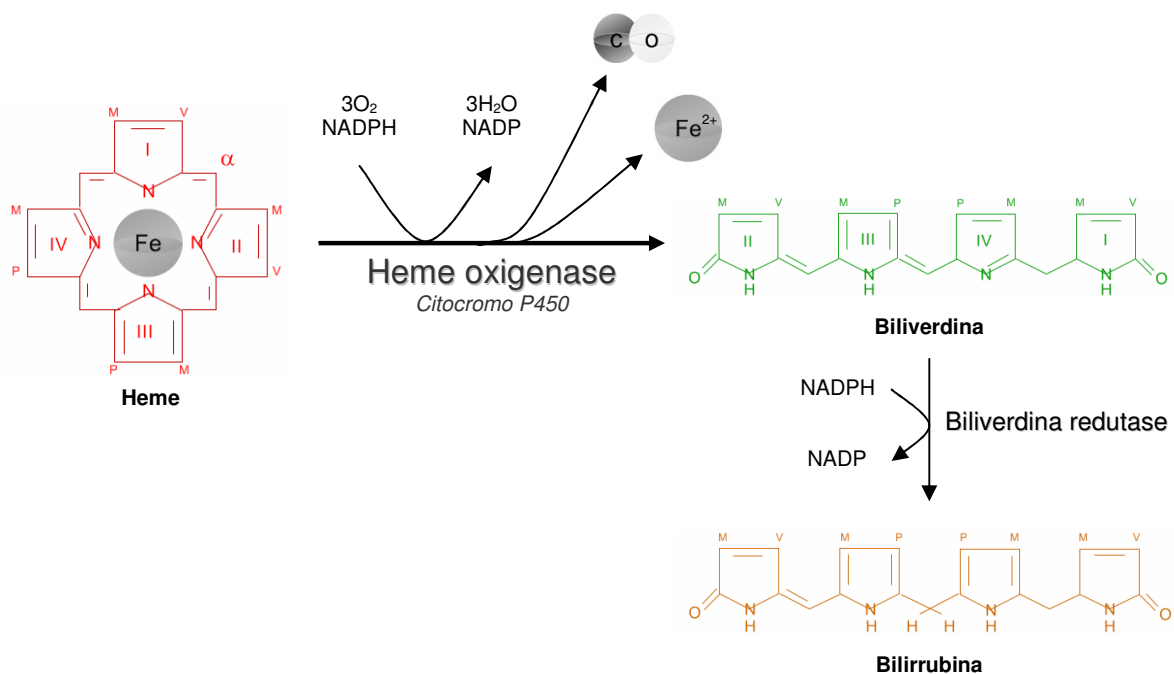


Figura 1.2 Degradação enzimática do heme pela heme oxigenase, gerando biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro (Fe²⁺). O CO é liberado pela oxidação do carbono da ponte de meteno- α por oxigênio molecular. Os grupos terminais de oxigênio da biliverdina também derivam de oxigênio molecular. A reação é dependente de equivalentes redutores derivados do NADPH via NADPH-citocromo P450 redutase. A biliverdina é subsequentemente convertida a bilirrubina pela enzima biliverdina redutase. M representa metil; V, vinil; P, propionil.

1.2.2- Biliverdina, bilirrubina e biliverdina redutase

Após a clivagem do anel de heme pela HO-1, a biliverdina resultante é rapidamente convertida a bilirrubina pela ação da enzima biliverdina redutase (BVR). Diferentemente da biliverdina, a bilirrubina é uma molécula hidrofóbica e, portanto, deve associar-se à albumina para ser transportada pela corrente sanguínea. A bilirrubina circulante é captada pelos hepatócitos onde é conjugada ao ácido glicurônico pela UDP (Uridina difosfato)-glicoruniltransferase, um processo necessário para gerar um composto hidrofílico que possa então ser excretado na bile. Em neonatos, níveis muito elevados de bilirrubina circulante estão associados ao *kernicterus*, uma encefalopatia de ocorrência rara que pode levar à morte ou deixar seqüelas neurológicas (Dennery, *et al.*, 2001).

Se vista simplesmente como parte do catabolismo do heme, a conversão de biliverdina a bilirrubina dificilmente é justificável, pois emprega energia para gerar um produto de difícil excreção, potencialmente tóxico e sem vantagens biológicas aparentes sobre o seu precursor.

Esse suposto paradoxo começou a ser esclarecido a partir da descoberta do importante papel antioxidante da bilirrubina. Em concentrações fisiológicas, a bilirrubina é uma das principais moléculas de proteção contra o estresse oxidativo no plasma (Stocker, *et al.*, 1987). No ambiente intracelular, foi proposto um ciclo onde a bilirrubina reage diretamente com espécies reativas de oxigênio, neutralizando sua propagação. Nessa reação a bilirrubina é oxidada, convertendo-se a biliverdina. A biliverdina é então reduzida novamente a bilirrubina pela BVR, perpetuando o ciclo. Esse mecanismo explicaria como as diminutas concentrações de biliverdina observadas nas células possuem uma potente capacidade antioxidante (Baranano, *et al.*, 2002).

Recentemente, a BVR vem sendo caracterizada como uma peça central em diversas vias de sinalização celular. Além da sua função de redutase, já descrita, a BVR também é um fator de transcrição do tipo *b-zip*. Como tal é capaz de migrar para o núcleo da célula e ligar-se a sítios AP-1 do DNA, regulando a transcrição de genes fundamentais na resposta ao estresse celular mediada pela HO-1 e outras proteínas (Kravets, *et al.*, 2004). A diminuição dos efeitos da HO-1 observada quando a BVR é bloqueada experimentalmente, sugere uma importante relação entre essas duas enzimas (Miralem, *et al.*, 2005). Ainda foi descrita uma terceira função da BVR, que atua como uma quinase na via do receptor de insulina, essencial para o controle de funções como o metabolismo da glicose, apoptose e crescimento celular (Lerner-Marmarosh, *et al.*, 2005).

1.2.3- Monóxido de carbono

O CO é um gás incolor e inodoro cuja toxicidade é conhecida e estudada há séculos. Os efeitos tóxicos do CO correlacionam-se primariamente à sua ligação de alta afinidade ao grupamento heme da hemoglobina, inibindo competitivamente a ligação do oxigênio, o que resulta em hipóxia tecidual. Níveis de carboxihemoglobina de 20% já provocam sintomas, sendo letais ao atingir 50% a 80% (Ryter and Otterbein, 2004).

O CO é produzido pelo organismo quase que exclusivamente como resultado do metabolismo do heme pela HO. Essa produção endógena se dá em doses muito inferiores às caracterizadas como tóxicas, e recentemente vem sendo implicada em uma série de processos fisiológicos. Grande parte desses efeitos do CO é mediada por sua ligação ao grupamento heme da guanilato ciclase, que resulta na ativação dessa enzima. Esse mecanismo é responsável pela atividade do CO como vasodilatador, inibidor da agregação plaquetária e neurotransmissor. O CO também possui funções independentes de sua ligação a hemoproteínas, como efeitos antiinflamatórios mediados pela ativação da MAP (*mitogen-activated protein*) quinase p38 (Ryter, *et al.*, 2006).

1.2.4- Ferro e ferritina

O ferro é pró-oxidante e seu acúmulo é tóxico para as células. Ao mesmo tempo em que gera ferro livre, a HO-1 modula seus níveis, aumentando o efluxo celular deste íon (Ferris, *et al.*, 1999). A HO-1 também aumenta a expressão de ferritina, que se associa ao ferro protegendo a célula do dano oxidativo (Balla, *et al.*, 1992). No entanto, a ferritina não parece participar dos mecanismos de citoproteção mediados pela HO-1 em animais estimulados pelo LPS (Otterbein, *et al.*, 1997).

1.2.5- Heme oxigenase-1 e doenças

A multiplicidade de efeitos biológicos mediados pela HO-1 pode ter implicações em um grande número de doenças. O papel da modulação da HO-1 no desenvolvimento de vasculopatias, por exemplo, vem sendo alvo de intensa pesquisa. A expressão da HO-1 está aumentada em células endoteliais, espumosas e fibras musculares lisas derivadas de lesões ateroscleróticas em diversos estágios de desenvolvimento (Wang, *et al.*, 1998). Em um modelo animal, observou-se o agravamento ou atenuação da aterosclerose pela inibição ou ativação da HO-1, respectivamente (Ichiyama, *et al.*, 2002). Os efeitos anti-inflamatórios da sinvastatina (que contribuem para sua ação antiaterogênica) podem estar relacionados, em parte, à expressão da

HO-1 nas fibras musculares lisas da parede vascular (Lee, *et al.*, 2004). O tratamento com o CO ou a biliverdina suprime a estenose que se segue à lesão endovascular por balão em animais, de forma semelhante à observada pela superexpressão da HO-1 (Nakao, *et al.*, 2005; Otterbein, Zuckerbraun, *et al.*, 2003; Tulis, *et al.*, 2001). A esses achados soma-se a caracterização, em humanos, de polimorfismos no gene da HO-1 como fatores de risco independentes para a reestenose pós-angioplastia (Chen, *et al.*, 2004).

A medicina de transplante é um outro campo onde a pesquisa pré-clínica relacionada à HO-1 vem produzindo resultados surpreendentes. Em um modelo de xenotransplante cardíaco de camundongos para ratos imunossuprimidos por drogas, a rejeição normalmente não ocorre. No entanto, quando os animais doadores são deficientes do gene da HO-1 ou a enzima é farmacologicamente inibida, a deterioração do coração se dá rapidamente. O tratamento do doador e receptor com o CO foi capaz de reverter esse fenômeno, compensando a ausência da HO-1 (Bozza, *et al.*, 1998). Resultados semelhantes foram obtidos através da terapia com a biliverdina, bem como em modelos de transplante de outros órgãos (Song, *et al.*, 2003; Taniguchi, *et al.*, 1999).

A importância da HO-1 está sendo determinada em diversas outras situações, apesar das evidências ainda serem limitadas ou conflitantes. A expressão de HO-1 está aumentada em células inflamatórias de pacientes asmáticos, e terapia com o CO diminui a asma induzida por alérgenos em camundongos (Barba, *et al.*, 1997; Horvath, *et al.*, 1998). A inalação de CO também foi capaz de atenuar a lesão pulmonar induzida pela hiperóxia em ratos (Otterbein, *et al.*, 1999). Esse efeito, no entanto, não foi confirmado por outro estudo semelhante (Clayton, *et al.*, 2001). A HO-1 também parece desempenhar um efeito protetor em modelos de lesão renal e hepática agudas (Lanahan, *et al.*, 1992; Rensing, *et al.*, 1999). Os efeitos anti-proliferativos da HO-1 podem resultar na diminuição de tumores (Hill, *et al.*, 2005). No entanto, a expressão de HO-1 nas células tumorais também pode protegê-las da quimioterapia ou radioterapia (Berberat, *et al.*, 2005).

1.2.6 Heme oxigenase-1 e sepse/SIRS

A expressão da HO-1 pode ser benéfica na sepse. Um estudo demonstrou um aumento nos níveis de CO exalado, um marcador da atividade HO-1, em pacientes com sepse grave de diversas etiologias. Os níveis de CO correlacionaram-se positivamente com a sobrevivência, apesar do tamanho da população estudada não permitir a sua caracterização como variável prognóstica independente (Zegdi, *et al.*, 2002). A significância da expressão da HO-1 no desenvolvimento da

disfunção orgânica na sepse e SIRS pôde ser elucidada em modelos animais. Ratos submetidos à ligadura e punção cecal (CLP) desenvolvem uma peritonite fecal grave e choque séptico. Nos leucócitos do sangue periférico desses animais, a elevação precoce da expressão da HO-1 está associada à diminuição de marcadores séricos de estresse oxidativo (lipoperoxidação) e de disfunções hepática (aspartato aminotransferase - AST, alanina aminotransferase - ALT) e renal (creatinina) (Jao, *et al.*, 2005). Por outro lado, quando a inflamação sistêmica foi induzida pela administração de LPS em camundongos deficientes do gene da HO-1, observou-se um aumento nos mesmos parâmetros de disfunções hepática, renal e estresse oxidativo, além de uma maior mortalidade em relação ao grupo controle (Pellacani, *et al.*, 1998). A HO-1 parece ser um importante efetor da proteção mediada pela IL-10 (uma citocina anti-inflamatória) contra o choque por LPS, o que é sugerido pela atenuação dessa proteção quando se inibiu farmacologicamente a HO-1 (Lee and Chau, 2002).

Em humanos com síndrome do desconforto respiratório agudo (SARA), observa-se uma elevação da HO-1 no lavado broncoalveolar (BAL) e em amostras de tecido pulmonar (Mumby, *et al.*, 2004). Esse aumento pode ser responsável por um efeito protetor, sugerido pelos achados em um modelo experimental de SARA induzida por LPS em ratos. Nesse estudo, o pré-tratamento com um indutor da HO-1 reduziu de forma importante a inflamação pulmonar característica dessa doença, enquanto que a inibição da HO-1 teve o efeito inverso, agravando o quadro (Otterbein, *et al.*, 1995). A HO-1 também pode ser importante para a preservação da função de músculos da ventilação na sepse. O déficit contrátil do diafragma observado após a injeção intravenosa de LPS em ratos é agravado pela inibição da HO-1 (Barreiro, *et al.*, 2002).

De forma semelhante à observada na SARA, a lesão inflamatória intestinal que acompanha a SIRS induzida por LPS ou isquemia de membro em animais é acentuada pela inibição da HO-1 (Fujii, *et al.*, 2003; Scott, *et al.*, 2005).

Alguns estudos recentes começam a investigar os produtos da HO-1 como agentes terapêuticos na sepse experimental. Em ratos, a inalação de CO em baixas concentrações por uma hora reduziu a mortalidade da administração subsequente de LPS em mais de 60%. No grupo tratado houve uma diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e um aumento da IL-10 mensurados no soro. No BAL, observou-se uma modulação semelhante no perfil das citocinas, acompanhada de uma redução no acúmulo de neutrófilos, proteínas, nitrito e LDH (*lactic dehydrogenase*). O nível sérico de AST encontrava-se menor nos animais expostos ao CO, sugerindo um menor dano hepático nesse grupo. O padrão da expressão de iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) observada sugere um efeito diferenciado sobre a produção de

NO no fígado (aumento) e no pulmão (diminuição) dos animais tratados com CO (Sarady, *et al.*, 2004).

O pré-tratamento com injeções intraperitoneais de biliverdina também reduziu drasticamente a mortalidade do choque induzido por LPS em ratos (13% vs 80% no grupo controle). De forma correlata à observada no tratamento com o CO, a biliverina provocou uma redução na inflamação pulmonar e sistêmica. A ativação de NF- κ B (um fator de transcrição que modula a expressão de genes envolvidos na inflamação) encontrava-se reduzida nos animais tratados. A administração de um inibidor da HO-1 reverteu a proteção da biliverdina, o que sugere a HO-1 é um mediador fundamental para os efeitos do tratamento (Sarady-Andrews, *et al.*, 2005).

A administração de D-galactosamina em conjunto com o LPS resulta em um grave dano hepático mediado por citocinas. Nesse modelo, demonstrou-se em camundongos proteção hepática (analisada por marcadores séricos e análise histológica) e redução da mortalidade pelo tratamento com um ativador da expressão da HO-1. A administração isolada de CO ou biliverdina diminuiu o dano hepático, mas não alterou a mortalidade. No entanto, quando esses agentes foram administrados conjuntamente, houve uma importante diminuição da mortalidade, semelhante à observada pela indução da HO-1 (Sass, *et al.*, 2004).

Utilizando o modelo de CLP, investigou-se o impacto do tratamento com a biliverdina sobre a inflamação e dismotilidade gastrointestinais em ratos. Nos animais submetidos à CLP, observou-se uma intensa infiltração neutrofílica no jejuno e diminuição do trânsito do trato gastrointestinal. Injeções intraperitoneais de biliverdina administradas antes e após a CLP atenuaram significativamente esses efeitos. Observou-se um aumento de IL-10 e diminuição de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), no intestino dos animais tratados, o que poderia fazer parte dos mecanismos efetores da biliverdina. O tratamento aumentou a atividade de NF- κ B no intestino, o que difere dos achados anteriormente mencionados em pulmões, enquanto que a expressão de HO-1 e BVR não sofreu alterações (Overhaus, *et al.*, 2006).

Apesar do conjunto de evidências apresentado sugerir de forma consistente um papel protetor da HO-1 na sepse, esses resultados devem ser interpretados com cautela. Modelos de endotoxemia (empregados na grande maioria dos estudos mencionados) são tradicionalmente utilizados por sua facilidade técnica e capacidade de simular alguns aspectos da fisiopatologia da sepse. No entanto esses modelos não compreendem a complexidade da resposta observada na sepse com infecção por microorganismos viáveis. Por isso, a transposição de resultados obtidos em modelos de endotoxemia para benefício clínico real em humanos com sepse pode apresentar

limitações. Nesse sentido, tornam-se necessários mais estudos utilizando modelos de maior complexidade como a CLP, considerada atualmente o “padrão ouro” para a pesquisa pré-clínica da sepse (Buras, et al., 2005).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

- Investigar o potencial da heme oxigenase-1 (HO-1) como alvo terapêutico na sepse experimental, principalmente através da terapia com a biliverdina, um dos produtos dessa enzima.

2.2- Objetivos específicos

- Avaliar o impacto da administração de um inibidor (estanho protoporfirina) e um ativador (cobalto protoporfirina) sistêmicos da HO-1 sobre a mortalidade no modelo de ligadura e punção cecal (CLP).
- Avaliar o impacto do tratamento com a biliverdina sobre a mortalidade nos modelos de administração intraperitoneal de LPS e CLP.
- Investigar o efeito do tratamento com a biliverdina sobre o acúmulo de leucócitos e o perfil de secreção de citocinas na cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP.
- Investigar o efeito do tratamento com a biliverdina sobre a eliminação bacteriana na cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Parecer do comitê de ética animal

Os protocolos utilizados foram aprovados pelo comitê de Ética no uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ), licença nº P.0260/05 (Anexo).

3.2- Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss de ambos os sexos, com peso entre 20 e 25 g, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Durante a permanência em nosso biotério, os animais foram mantidos em temperatura constante (25 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e comida.

3.3- Endotoxemia

Os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de LPS de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4 (Sigma Chemical Co.) na dose de 1 mg/cavidade e foram acompanhados diariamente (0-144 h) para as análises de mortalidade.

3.4- Laparotomia seguida de ligadura e punção cecal (CLP)

Animais previamente anestesiados com ketamina (80 mg/kg, i.p.) e tiopental (40 mg/kg, i.p.) foram submetidos a laparotomia de aproximadamente 1 cm. Em seguida o ceco foi ligado logo abaixo da válvula íleo-cecal (sem impedir, portanto, o trânsito intestinal entre o íleo e o cólon) com fio de algodão 3-0 e perfurado uma vez com uma agulha 18 G. A ligadura se deu de forma a ocluir completamente a luz do ceco, exceto nos experimentos com a estanho protoporfirina, onde o ceco foi ligado em apenas 50% do seu diâmetro, com o objetivo de reduzir a letalidade. O abdômen foi suturado em dois planos com fio de nylon 3-0 e os animais receberam 0,5 ml de solução salina por via subcutânea (s.c.) imediatamente após o fechamento da cavidade. O grupo controle negativo (sham) foi submetido a laparotomia sem ligadura ou perfuração do ceco. Para as análises de mortalidade, os animais foram monitorados diariamente (0-144 h). Para as demais análises, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂ após 6 ou 24 horas.

3.5- Tratamentos

A drogas cobalto protoporfirina (CoPP), estanho protoporfirina (SnPP) e biliverdina (Frontier Scientific) foram inicialmente diluídas em NaOH 0,1N e subsequentemente em NaCl 0,9% para as concentrações finais. O pH das soluções foi ajustado para 7,4 com HCl 1N. A CoPP, foi injetada i.p. (5 mg/kg) 24 horas antes da CLP ou da remoção do fígado, coração e pulmões. A SnPP foi injetada i.p. (25 mg/kg) imediatamente após a CLP. A biliverdina (35 mg/kg) foi administrada: (1) i.p. ou s.c. 18 horas antes, imediatamente após e 24 horas após a CLP para análises de mortalidade; (2) i.p. 3 horas após a CLP para análises de mortalidade; (3) i.p. 18 horas antes e imediatamente após a CLP para coleta de sangue e lavado peritoneal e (4) i.p. 18 horas antes e 2 horas antes da injeção de LPS para análises de mortalidade.

3.6- Coleta de lavado peritoneal, fígado, coração e pulmões

Para obtenção do lavado peritoneal, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂ e em seguida a cavidade peritoneal foi aberta e lavada com 3 ml de salina (NaCl 0,9%). Para a análise posterior de citocinas, as amostras de lavado peritoneal foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado a -70 °C. Para a coleta de órgãos, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂. A veia porta, ventrículos cardíacos e artéria pulmonar foram canulados e perfundidos com aproximadamente 5 ml de salina para remoção do sangue do interior do fígado, coração e pulmões. Em seguida esses órgãos foram removidos e armazenados a -160 °C.

3.7- Contagem das células do lavado peritoneal

A contagem total de leucócitos no lavado peritoneal foi feita através de microscopia óptica (aumento de 100x) em câmaras de Neubauer, após diluição (40x) das amostras em solução de Turk. Para a análise diferencial de leucócitos foram preparados citoesfregaços das amostras em citocentrífuga (450 rpm por 5 min). Em seguida as lâminas foram fixadas e coradas por imersão em solução de May-Grünwald por 3 minutos, 2 minutos em água e 15 minutos em solução de Giemsa. Utilizando-se a objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x) de microscópio óptico foram contadas 100 células contínuas em cada lâmina. A quantificação de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células.

3.8- Dosagem de citocinas

Um kit para a detecção simultânea das citocinas murinas IL-1 β , IL-4, IL-6, KC (*keratinocyte-derived chemokine*), IL-10, IL-12, IFN- γ , MCP-1, TNF- α) baseado em microesferas fluorescentes foi obtido e o ensaio realizado conforme as recomendações do fabricante (Bio-Rad). Inicialmente, os padrões apropriados para as citocinas e as amostras (50 μ l), diluídas em tampão de diluição, foram adicionadas aos poços de uma placa de 96 poços com filtro Multiscreen-BV (Milipore Corporation). As amostras foram incubadas com 50 μ l da mistura de microesferas acopladas aos anticorpos específicos (2000 bilhas/poço) à temperatura ambiente por 30 min no escuro e com agitação (300 rpm). O filtro foi lavado três vezes com 100 μ l do tampão de lavagem. Os anticorpos de detecção (25 μ l/poço) foram adicionados aos poços e posteriormente incubados à temperatura ambiente por 30 min no escuro e com agitação. O filtro foi novamente lavado três vezes com 100 μ l do tampão de lavagem. A estreptavidina acoplada ao fluoróforo foi adicionada aos poços e a incubação à temperatura ambiente com agitação foi mantida por mais 10 min. Os marcadores não ligados foram filtrados através dos poços utilizando-se um sistema de filtragem a vácuo. Após a última lavagem, 125 μ l do tampão de ensaio foram adicionados a cada placa. As amostras foram analisadas no sistema Bio-Plex (Bio-Rad) conforme as instruções do fabricante. As análises dos dados foram efetuadas através do Bio-Plex Manager software.

3.9- Incubação de bactérias em solução de biliverdina

Uma solução de biliverdina na concentração de 3 mg/ml foi preparada como especificada no item 3.5. Em seguida adicionou-se à solução de biliverdina ou veículo (controle) *Escherichia coli* (ATCC25922), obtendo-se uma concentração de 10⁴ bactérias/ml. As soluções com bactérias foram incubadas por 2 horas em estufa a 37 °C.

3.10- Determinação de unidades formadoras de colônias de bactérias (UFC)

Amostras de lavado peritoneal ou de bactérias incubadas foram submetidas a diluições seriadas, aplicadas a placas de ágar e incubadas em estufa a 37 °C. Após 24h, o número de UFC foi contado.

3.11- Western blotting para HO-1

As amostras de coração, fígado e pulmões foram rapidamente pulverizados em gral e pistilo submersos em nitrogênio líquido. Em seguida, 100 miligramas de cada tecido foram pesados em um tubo aonde foi adicionado 100 µL do tampão de homogenização (50 mM de Tris-Cl pH 8,0; 150 mM de NaCl, 0,1% Triton X-100; 1% NP-40), e uma mistura de inibidores de protease (1µg/ml aprotinina, 1µg/ml leupeptina, 5 mM PMSF- *Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride*). Após a homogenização estas amostras foram centrifugadas a 14000 rpm em uma microcentrífuga refrigerada por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado, e em seguida as proteínas foram dosadas através do método de Lowry (Lowry, et al., 1951). Cinquenta microgramas de proteína foram resolvidas em um gel de poliacrilamida desnaturante a 10% (SDS-PAGE- *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) e em seguida este gel foi eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose (190 mA, por 90 minutos) utilizando-se um sistema semi-seco (BioRad) na presença do tampão de transferência (25 mM Tris.Cl pH 8,3; 190 mM glicina; 20% metanol e 0,1 % SDS).

Após a transferência a membrana foi bloqueada por uma hora na presença de uma solução 5% de leite em pó desnatado e em seguida incubada com o anticorpo anti-HO-1 (Stressgene) na diluição de 1:1000 por 2 horas em temperatura ambiente com agitação. Após esta incubação, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com um solução de PBS (*phosphate buffered saline*) na presença de Tween 0,1 %. Logo após, o anticorpo secundário (Pierce) acoplado à peroxidase foi adicionado (diluição 1:10000) em uma incubação de 40 minutos e em seguida retirado. A membrana foi então novamente lavada por 3 vezes com a solução de PBS-Tween descrita acima e revelada com um kit de ECL (*enhanced chemoluminescence*) de acordo com as instruções do fabricante (Pierce).

3.12- Análises estatísticas

Os dados de sobrevida foram comparados utilizando-se o teste log-rank. Para as demais análises foi utilizado o teste Mann-Whitney. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4- RESULTADOS

4.1 A modulação da HO-1 altera a mortalidade da sepse induzida por CLP

Para investigarmos o efeito da modulação da HO-1 sobre o prognóstico da sepse, utilizamos o modelo de ligadura e punção cecal (CLP), que induz sepse peritoneal polimicrobiana, e tratamento dos animais com a estanho protoporfirina (SnPP), um supressor da HO-1, ou a cobalto protoporfirina (CoPP), um indutor da HO-1. Registrou-se a mortalidade ao longo de 144 horas. As doses empregadas foram baseadas em um estudo prévio, onde a CoPP reduziu a mortalidade e a SnPP acentuou disfunção hepática em um modelo murino de endotoxemia (Sass, *et al.*, 2004). Nos experimentos com a SnPP, a ligadura do ceco foi realizada em apenas 50% do seu diâmetro (em oposição à ligadura total realizada nos demais experimentos de CLP), com o objetivo de reduzir a mortalidade da CLP, permitindo que se evidenciasse um possível efeito deletério do tratamento na sobrevivência dos animais.

Nossos resultados demonstraram que a administração de SnPP (25 mg/kg, i.p.) imediatamente após a CLP aumentou significativamente a mortalidade em aproximadamente 36,4% com relação aos controles (Figura 4.1). Por outro lado, observamos uma redução significativa na mortalidade (em aproximadamente 20,8%) dos animais tratados com CoPP (5 mg/kg, i.p.) 24 horas antes do CLP (Figura 4.2). Não houve aumento significativo desse efeito sobre a mortalidade ao utilizarmos uma dose cinco vezes maior de CoPP (25 mg/kg, i.p.) 24 horas antes da CLP (dados não representados na figura). Para avaliarmos a efetividade do tratamento com a CoPP na indução da HO-1, verificamos a expressão da enzima em diversos órgãos 24 horas após a administração de CoPP. Pudemos documentar por *western blotting* um aumento bastante evidente na expressão de HO-1 no coração, pulmões e fígado de camundongos CoPP na dose de 5 mg/kg de CoPP utilizada para os experimentos de mortalidade. Esse aumento parece ter sido maior no fígado do que em outros órgãos (Figura 4.3).

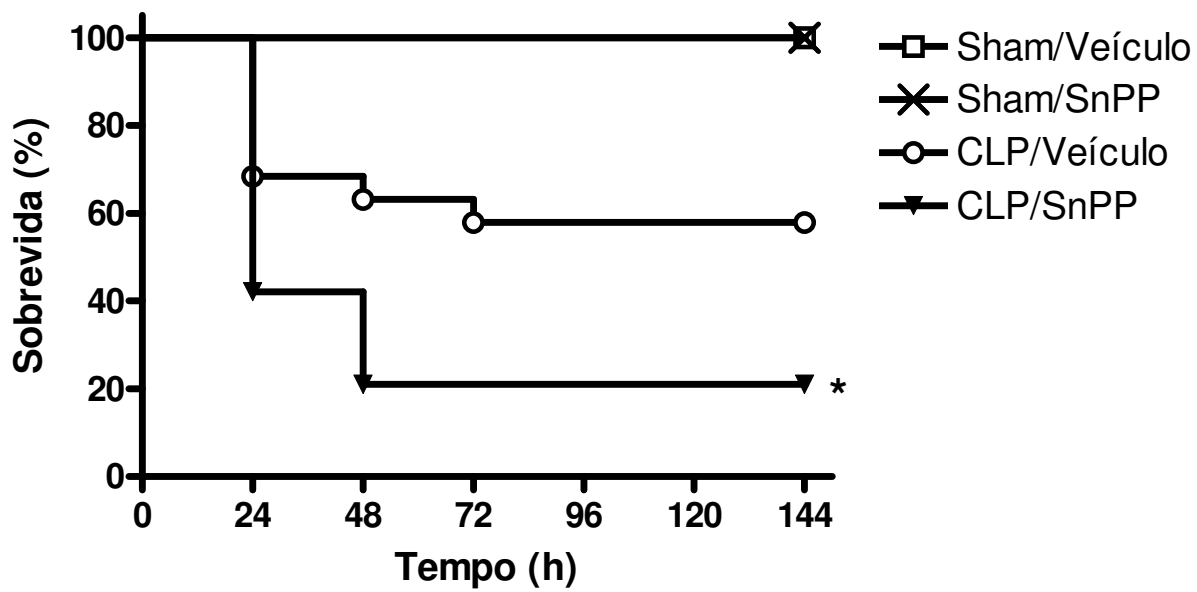


Figura 4.1- Efeitos da inibição da *HO-1* sobre a mortalidade induzida pela CLP. Camundongos foram injetados i.p. com SnPP (25 mg/kg) ou veículo imediatamente após a CLP. A taxa de sobrevivida foi monitorada diariamente por 144 horas. Os grupos experimentais consistem de 20 animais (CLP/SnPP e CLP/Veículo), 8 animais (Sham/Veículo) e 4 animais (SnPP/Veículo), representando a soma de 2 experimentos com resultados semelhantes. * $P < 0,05$ vs. CLP/Veículo (teste log-rank).

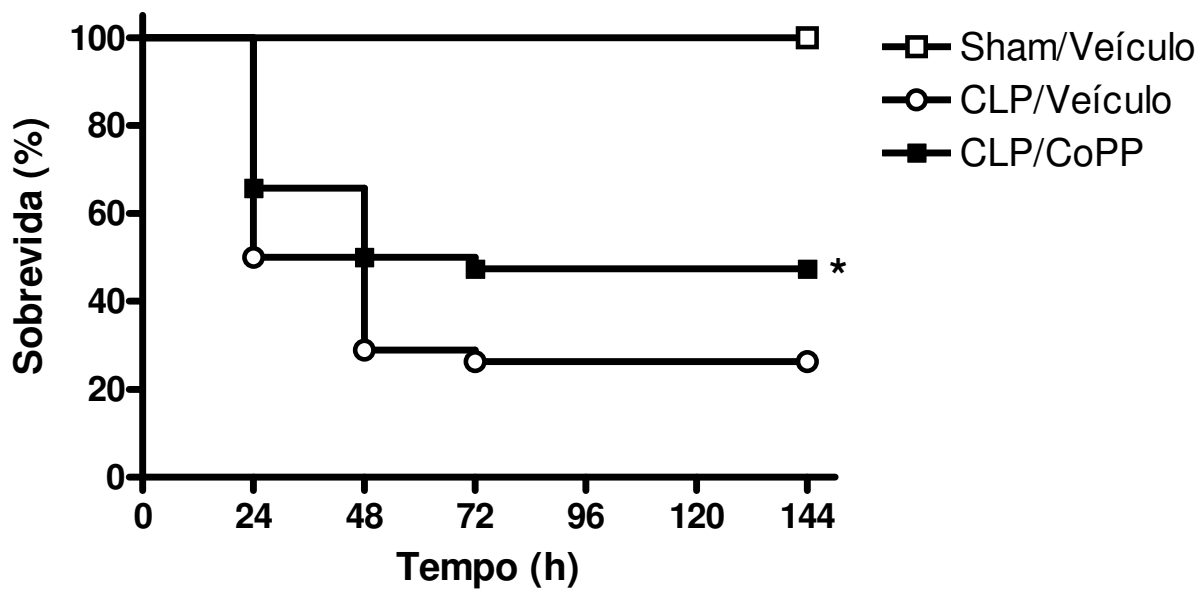


Figura 4.2- Efeitos da indução da *HO-1* sobre a mortalidade induzida pela *CLP*. Camundongos foram injetados i.p. com CoPP (5 mg/kg) ou veículo 24 horas antes da *CLP*. A taxa de sobrevivência foi monitorada diariamente por 144 horas. Os grupos experimentais consistem de 48 animais (*CLP/CoPP* e *CLP/Veículo*) e 20 animais (*Sham/Veículo*), representando a soma de 5 experimentos com resultados semelhantes. * $P < 0,05$ vs. *CLP/Veículo* (teste log-rank).

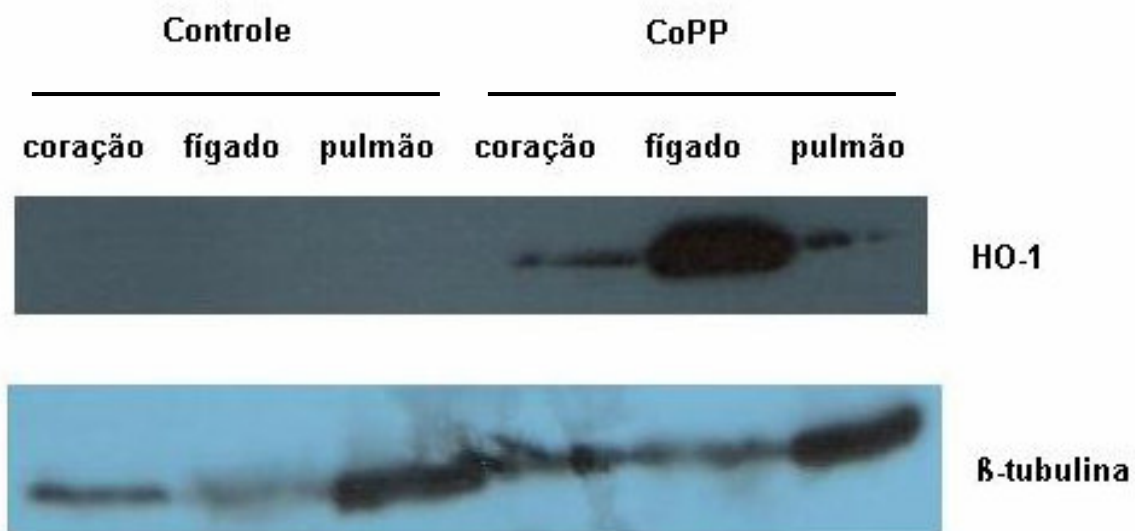


Figura 4.3- *Indução da HO-1 pela CoPP.* Camundongos (n= 3/grupo) foram injetados i.p. com CoPP (5 mg/kg) ou veículo e sacrificados após 24 horas, tendo seus pulmões, fígados e corações removidos. Em seguida homogenatos dos órgãos foram analisados por western blotting.

4.2 A biliverdina protege contra a endotoxemia letal

A administração exógena de biliverdina pode, em diversas situações, reproduzir os efeitos observados após a indução da HO-1 (Otterbein, Soares, *et al.*, 2003). Estudos prévios demonstraram que terapias empregando a biliverdina (como único agente ou em associação ao CO) podem apresentar efeitos benéficos em modelos de endotoxemia (Sarady-Andrews, *et al.*, 2005; Sass, *et al.*, 2004). Baseando-se nesses dados, testamos em camundongos o efeito de um regime de tratamento com a biliverdina cujo efeito protetor foi previamente demonstrado em um modelo de endotoxemia letal em ratos (Sarady-Andrews, *et al.*, 2005). Em nossos experimentos, a administração de LPS (1 mg/kg, i.p.) provocou 75% de mortalidade no grupo controle. Já no grupo tratado com biliverdina (35 mg, i.p.) 18 horas e novamente 2 horas antes da injeção de LPS apresentou apenas 15% de mortalidade ao longo de 144 horas (redução de 60% na mortalidade) (Figura 4.4).

4.3 A biliverdina protege contra a sepse induzida por CLP

Seguindo-se aos efeitos protetores observados no modelo de CLP após a indução da HO-1 e no modelo de choque endotóxico pelo tratamento com a biliverdina, buscamos caracterizar o efeito da terapia com a biliverdina sobre a mortalidade induzida pela CLP. Comparada à endotoxemia, a CLP é um modelo de sepse mais complexo e clinicamente relevante, envolvendo a presença de um foco infeccioso (Buras, *et al.*, 2005). A biliverdina (35 mg/kg) administrada i.p. 18 horas antes, imediatamente após, e 24 horas após a CLP protegeu os animais, com uma redução significativa na mortalidade de aproximadamente 44,5% (Figura 4.5). Para verificarmos se o fenômeno observado seria dependente da administração da biliverdina diretamente sobre o sítio da injúria (como foi o caso da via i.p. no modelo de CLP), repetimos o mesmo protocolo experimental, modificando apenas a via de administração de i.p. para subcutânea (s.c.). Nesse caso, o tratamento com a biliverdina também se mostrou eficaz, provocando uma redução significativa de 35% na mortalidade (Figura 4.6). Como os experimentos anteriores envolveram o pré-tratamento dos animais, buscamos caracterizar o impacto da terapia com a biliverdina quando iniciada posteriormente à CLP. Ao tratarmos os animais com uma única injeção de biliverdina (35 mg/kg, i.p.) 3 horas após a CLP, observamos uma redução na mortalidade de aproximadamente 26,7%. Apesar de apontar uma tendência a um efeito protetor, esse resultado não atingiu significância estatística ($P=0,0526$) (Figura 4.7).

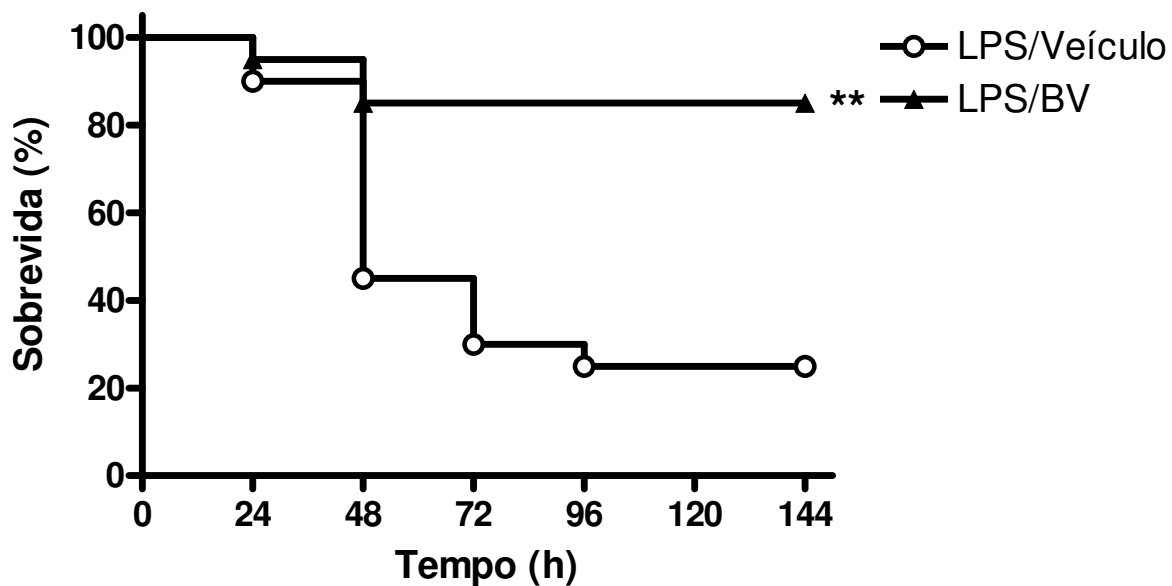


Figura 4.4- *Efeito da biliverdina sobre a mortalidade induzida pela endotoxemia.* Camundongos receberam injeções i.p. de biliverdina (35mg/kg) ou veículo 18 horas antes e novamente 2 horas antes do estímulo com LPS (1 mg/cav, i.p.). A taxa de sobrevivência foi monitorada diariamente por 144 horas. Os grupos experimentais consistem de 20 animais, representando a soma de 2 experimentos com resultados semelhantes. ** $P < 0,01$ vs. LPS/Veículo (teste log-rank).

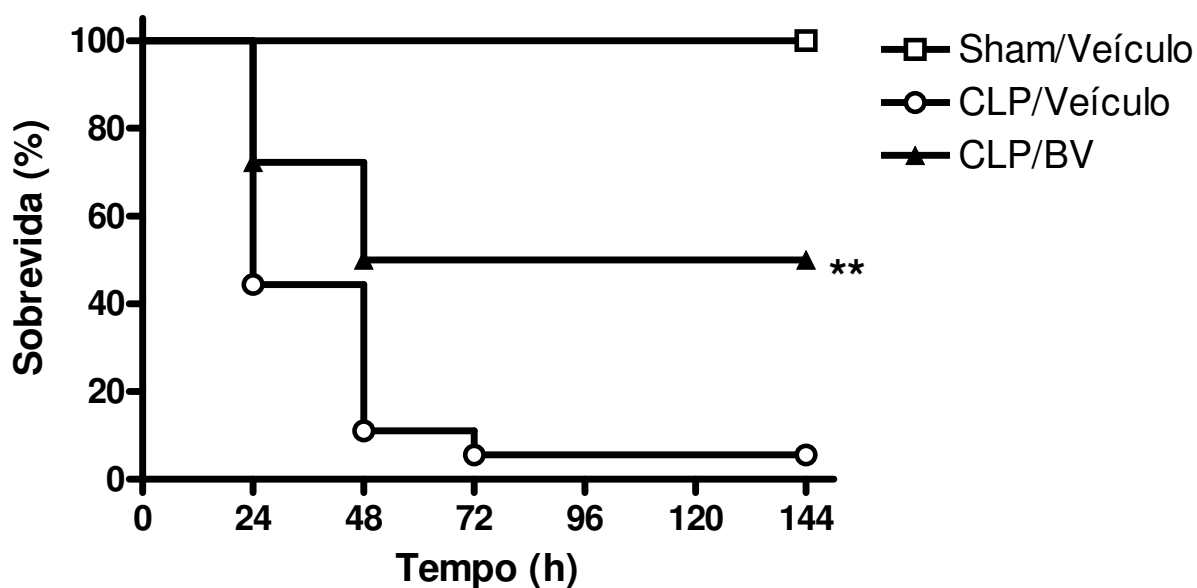


Figura 4.5- Efeito da biliverdina sobre a mortalidade induzida pela CLP: 3 doses i.p. Camundongos receberam injeções i.p. de biliverdina (35 mg/kg) ou veículo 18 horas antes, imediatamente após e 24 horas após a CLP. A taxa de sobrevivência foi monitorada diariamente por 144 horas. Os grupos experimentais consistem de 18 animais (BV/CLP e CLP/Veículo) e 8 animais (Sham/Veículo), representando a soma de 2 experimentos com resultados semelhantes. ** P < 0,01 vs. CLP/Veículo (teste log-rank).

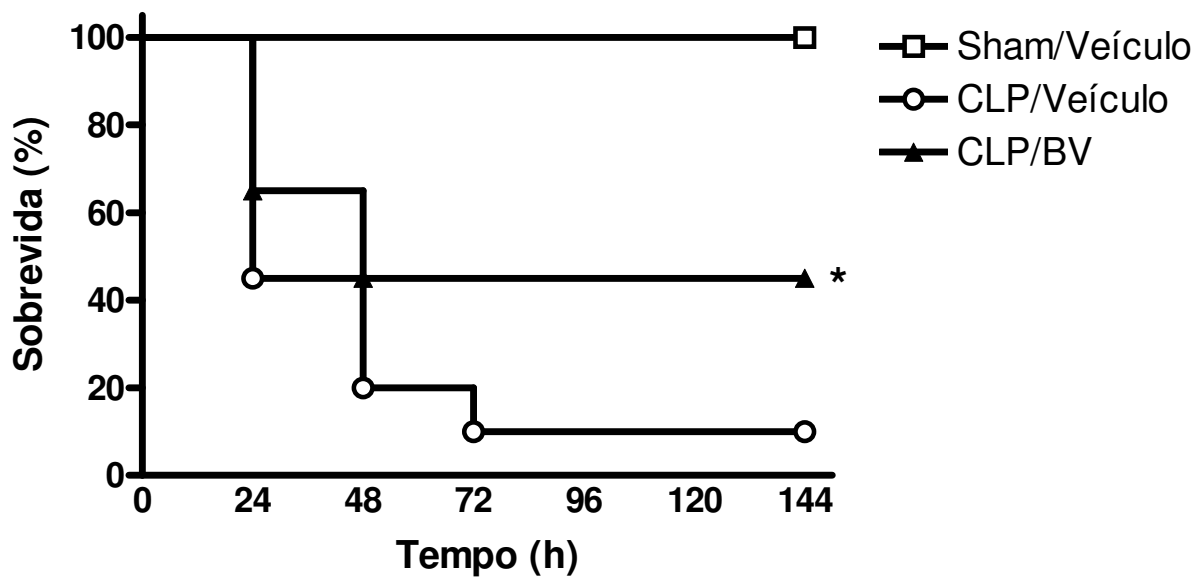


Figura 4.6- Efeito da biliverdina sobre a mortalidade induzida pela CLP: 3 doses s.c. Camundongos receberam injeções s.c. de biliverdina (35 mg/kg) ou veículo 18 horas antes, imediatamente após e 24 horas após a CLP. A taxa de sobrevivência foi monitorada diariamente por 144 horas. Os grupos experimentais consistem de 20 animais (BV/CLP e CLP/Veículo) e 8 animais (Sham/Veículo), representando a soma de 2 experimentos com resultados semelhantes.* $P < 0,05$ vs. CLP/Veículo (teste log-rank).

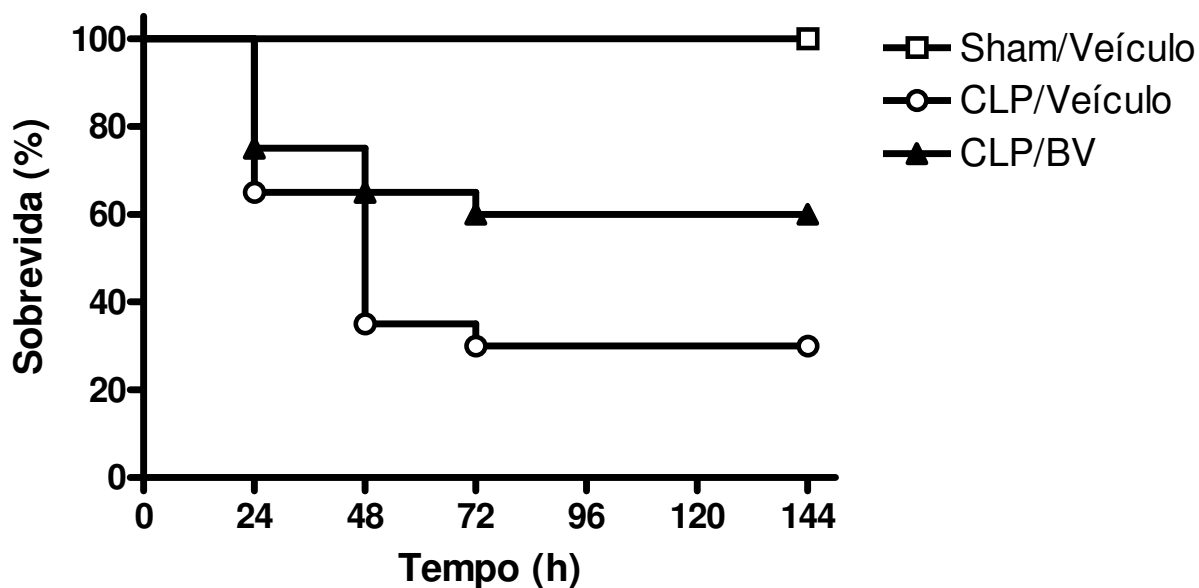


Figura 4.7- Efeito da biliverdina sobre a mortalidade induzida pela CLP: pós-tratamento. Camundongos receberam injeções i.p. de biliverdina (35 mg/kg) ou veículo 3 horas após da CLP. A taxa de sobrevivência foi monitorada diariamente por 144 horas. Os grupos experimentais consistem de 30 animais (CLP/CoPP e CLP/Veículo) e 12 animais (Sham/Veículo), representando a soma de 3 experimentos com resultados semelhantes. $P= 0.0526$ (CLP/BV vs. CLP/Veículo) (teste log-rank).

4.4 A biliverdina reduz o acúmulo de leucócitos no peritônio após a CLP

Nosso próximo passo foi verificar um potencial efeito modulador da inflamação pela biliverdina no modelo de sepse. A CLP provoca uma peritonite polimicrobiana, que cursa com influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal. Assim, analisamos o acúmulo de leucócitos no lavado peritoneal após a CLP. Os animais foram tratados com biliverdina (35 mg/kg, i.p.) 18 horas antes e imediatamente após a CLP. O acúmulo de leucócitos foi determinado nos tempos de 6 ou 24 horas após a CLP. Nossos resultados mostram que o grupo tratado com a biliverdina apresentou uma redução significativa na contagem de leucócitos totais, células mononucleares e neutrófilos do lavado peritoneal coletado 24 horas após a CLP. Dentre esses resultados, o efeito sobre o número de neutrófilos foi o mais evidente. No lavado peritoneal de 6 horas observamos uma redução do acúmulo de neutrófilos menos pronunciada, não atingindo significância estatística ($P= 0,0878$) (Figura 4.8).

4.5 A biliverdina modula o acúmulo de mediadores inflamatórios no peritônio após a CLP

Os mediadores inflamatórios influenciam o padrão de resposta à infecção e vem sendo implicados na fisiopatologia da sepse e como biomarcadores de progressão e gravidade da mesma. Analisamos os níveis dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-6 e KC (quimiocina murina homóloga funcional da IL-8 humana), bem como da citocina antiinflamatória IL-10 no lavado peritoneal coletado 24 horas após a CLP. No grupo tratado com biliverdina 18 horas antes e imediatamente após a CLP, observamos uma redução significativa nos níveis de IL-6, KC e TNF- α . Os níveis de IL-10 encontravam-se não significativamente reduzidos neste grupo (Figura 4.9).

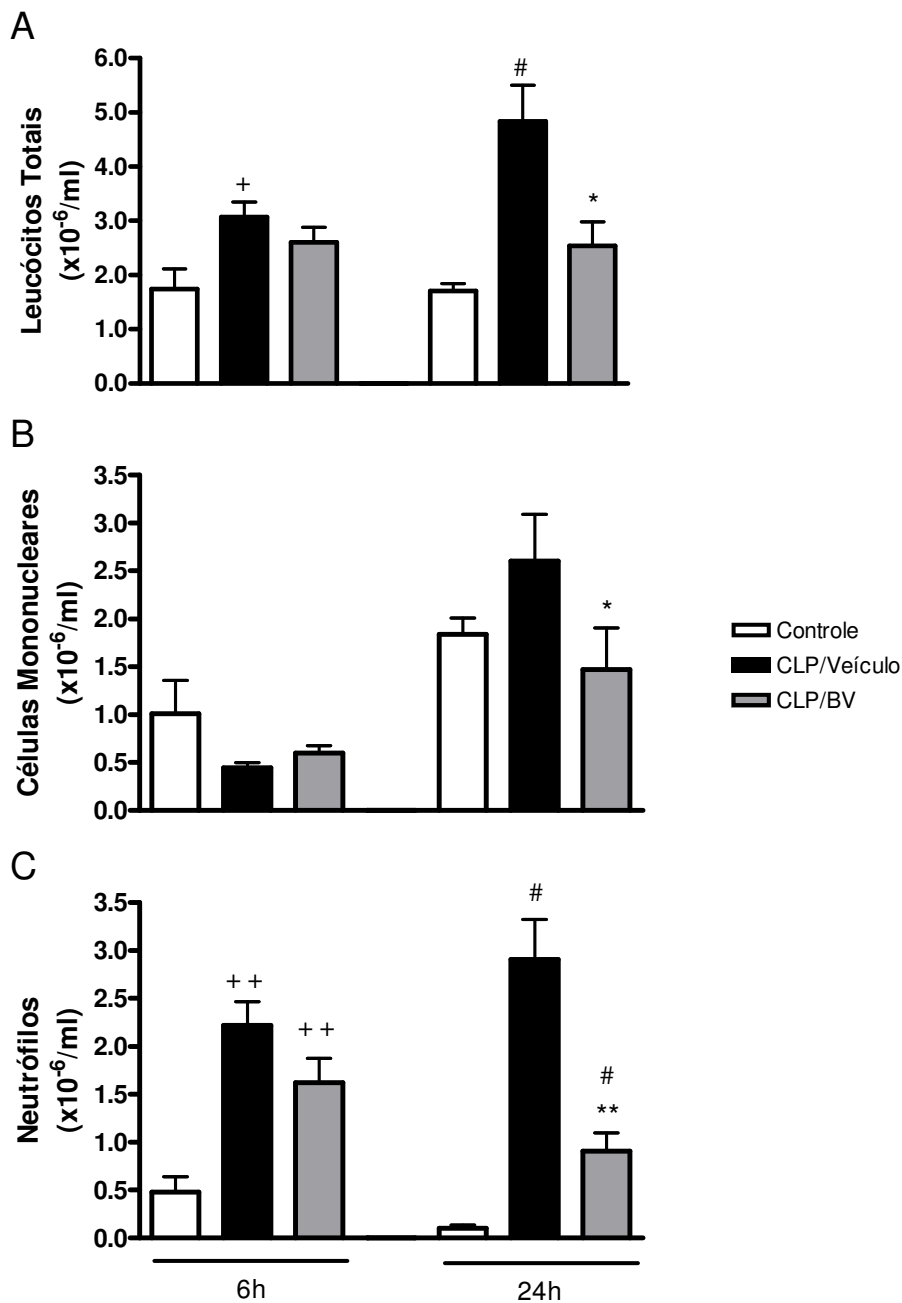


Figura 4.8- Efeito do tratamento com a biliverdina sobre o acúmulo de leucócitos no lavado peritoneal após a CLP. Camundongos receberam injeções i.p. de biliverdina (35mg/kg) ou veículo 18 horas antes e imediatamente após a CLP. Passadas 6 ou 24 horas, obteve-se o lavado peritoneal e o número de leucócitos foi determinado. O grupo controle é constituído de animais sham-operados que também receberam injeções i.p. do veículo nos mesmos intervalos. A figura representa a soma de dois experimentos com resultados semelhantes. Cada coluna representa a média + ou - EPM de 7-12 animais. *P< 0,05 e ** P< 0,01 vs. CLP/Veículo 24 h; # P<0,01 vs. Controle 24 h, + P< 0,05 e ++ P< 0,01 vs. Controle 6 h (teste Mann-Whitney).

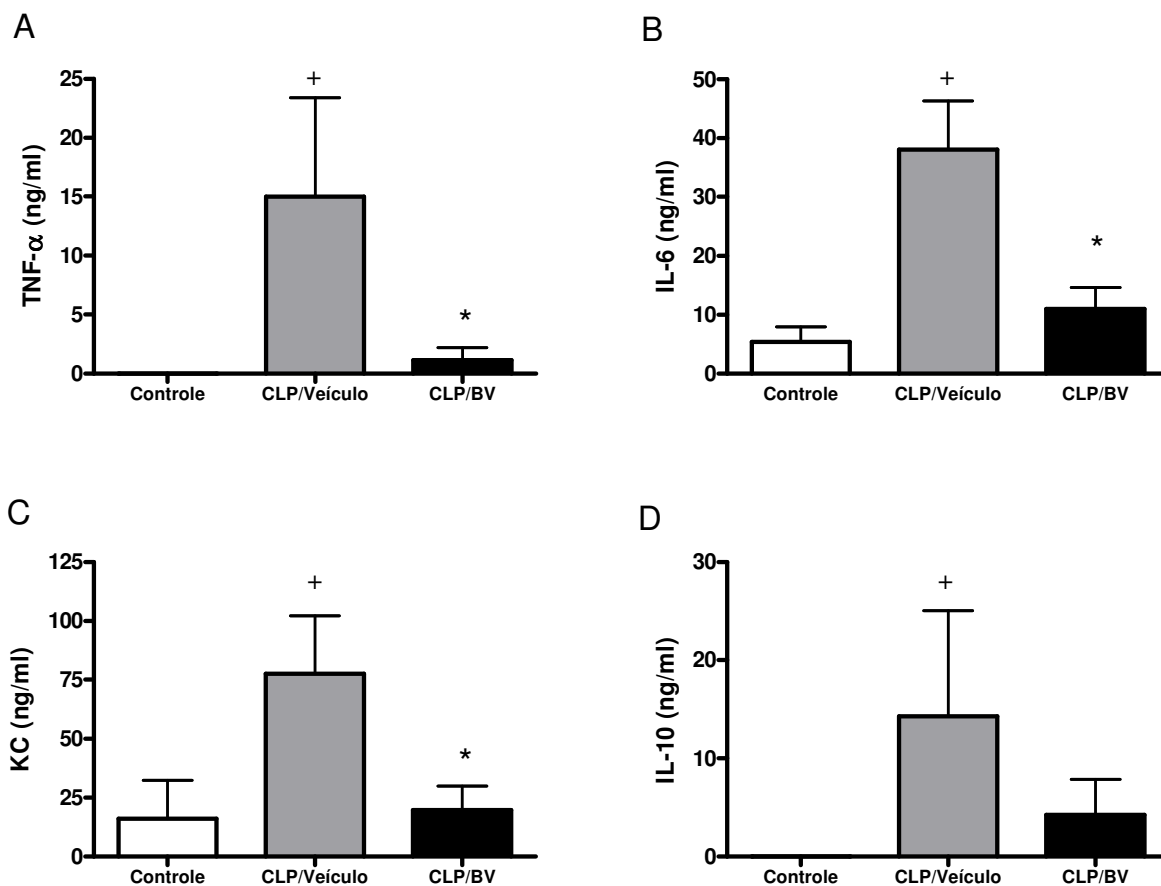


Figura 4.9- Efeito do tratamento com a biliverdina sobre o nível de citocinas no lavado peritoneal após a CLP. Camundongos receberam injeções i.p. de biliverdina (35mg/kg) ou veículo 18 horas antes e imediatamente após a CLP. Após 24 horas, obteve-se o lavado peritoneal e os níveis de TNF- α (A), IL-6 (B) KC (C) e IL-10 (D) foram determinados. O grupo controle é constituído de animais sham-operados que também receberam injeções i.p. do veículo nos mesmos intervalos. A figura representa a soma de dois experimentos com resultados semelhantes. Cada coluna representa a média + ou - EPM de 6-12 animais.* P< 0,05 vs. CLP/Veículo; + P<0,05 vs. Controle (teste Mann-Whitney).

4.6 A biliverdina aumenta a eliminação de bactérias no peritônio após a CLP

Considerando o efeito protetor da biliverdina sobre a mortalidade dos animais sépticos e seus efeitos sobre o acúmulo de leucócitos e a secreção de citocinas, buscamos avaliar as conseqüências do tratamento com biliverdina sobre o controle da infecção no modelo de CLP. Para tanto, quantificamos unidades formadoras de colônia (UFC) em culturas do lavado peritoneal coletado 6 ou 24 horas após a CLP. Nos animais tratados com biliverdina (35 mg/kg) 18 horas antes e imediatamente após a CLP, houve uma redução significativa no número de UFC do lavado peritoneal de 24 horas (Figura 4.10 B). Essa tendência também foi observada no lavado peritoneal de 6 horas, apesar de não ter atingido significância estatística ($P= 0,111$) (Figura 4.10 A).

4.7 A biliverdina não possui efeito direto sobre o crescimento bacteriano

O resultado anterior indica uma melhor eliminação bacteriana no sítio da infecção após o tratamento com a biliverdina. Uma hipótese considerada foi a de que esse fenômeno poderia ser devido a um efeito direto da solução de biliverdina sobre o crescimento bacteriano, especialmente porque a via de administração do tratamento (i.p.) correspondia ao compartimento primariamente infectado. Para testar essa hipótese, adicionamos *Escherichia coli* a uma solução com 3 mg/ml de biliverdina, correspondente à concentração média da solução administrada na cavidade peritoneal dos animais nos experimentos *in vivo*. Após duas horas de incubação, alíquotas dessa solução foram plaqueadas em placas contendo TSA. Após 24 horas o número de UFC foi determinado. Observamos um número de UFC semelhante em relação ao controle, sugerindo que um efeito direto da biliverdina não foi a causa da maior eliminação bacteriana observada após a CLP (Figura 4.11).

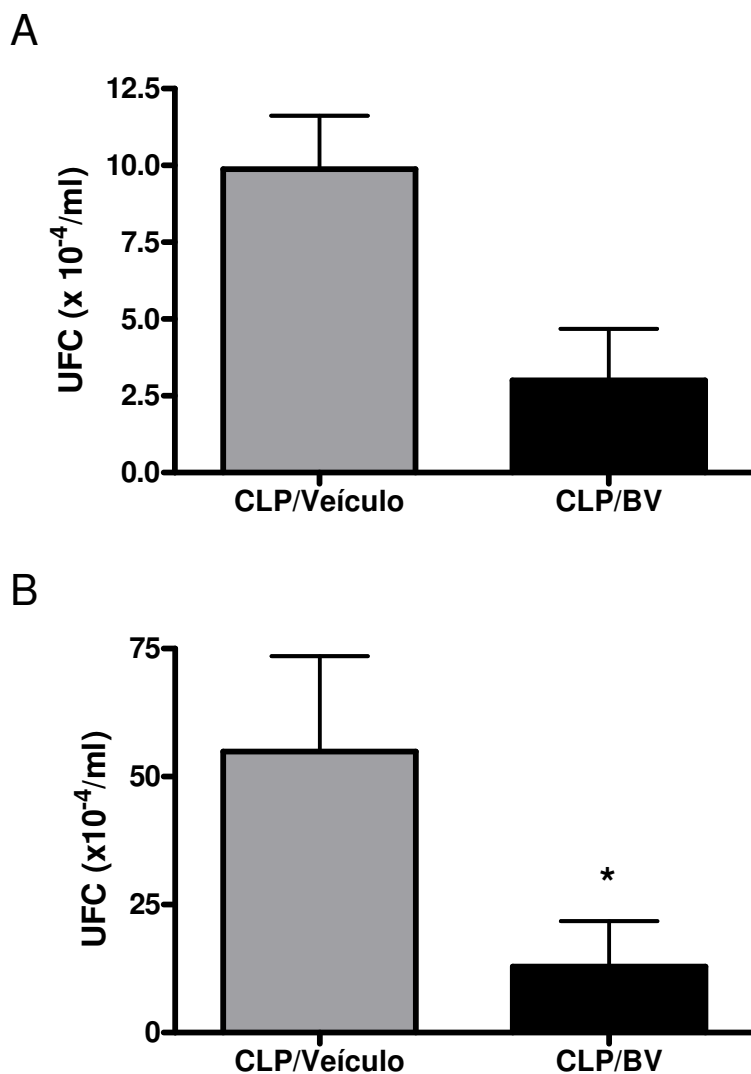


Figura 4.10- Efeito do tratamento com a biliverdina sobre o número de UFC no lavado peritoneal após a CLP. Camundongos receberam injeções i.p. de biliverdina (35 mg/kg) ou veículo 18 horas antes e imediatamente após a CLP. Passadas 6 (A) ou 24 (B) horas, obteve-se o lavado peritoneal e o número de UFC foi determinado. Em (A) está representado o único experimento realizado. Em (B) está representado um experimento de dois realizados com resultados semelhantes. Cada coluna representa a média + ou – EPM de 5-6 animais.* P< 0,05 vs. CLP/Veículo (teste Mann-Whitney).

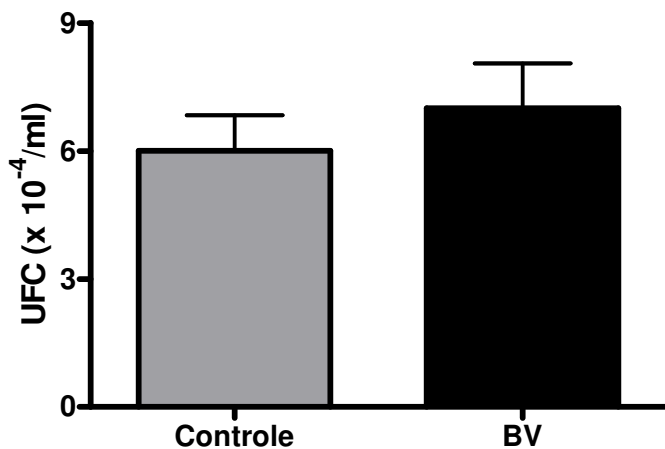


Figura 4.11- *Efeito direto da biliverdina sobre o crescimento bacteriano.* Bactérias (*Escherichia coli*) foram incubadas (10^4 bactérias/ml) em biliverdina (3 mg/ml) ou veículo por 2 horas. Em seguida as soluções foram aplicadas a placas contendo TSA e incubadas a 37 °C. Após 24 horas, número de UFC foi determinado. Cada coluna representa a média + ou - EPM de 5 amostras.

5- DISCUSSÃO

A sepse representa um grande desafio para sistemas de saúde em todo mundo, por sua elevada incidência, letalidade e custos. A terapia clínica da sepse está dirigida principalmente para a erradicação do agente causal (foco infeccioso) e para a correção dos distúrbios nas variáveis fisiológicas resultantes do desenvolvimento de disfunções orgânicas. A instituição precoce de antibioticoterapia, drenagem cirúrgica em casos selecionados, suporte hemodinâmico e respiratório constituem os fundamentos do tratamento dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva (Dellinger, *et al.*, 2004). Essa abordagem, portanto, não se baseia em intervenções dirigidas especificamente aos processos fisiopatológicos subjacentes responsáveis pela progressão da doença.

O paradigma atual coloca a causa fundamental das disfunções orgânicas, responsáveis pelas mortes relacionadas à sepse, em um desequilíbrio imunológico do hospedeiro que gera uma cascata de eventos bioquímicos, deteriorando a função fisiológica de diversos sistemas vitais (Marshall, 2001). Conseqüentemente, o estudo da fisiopatologia da sepse, buscando-se alvos terapêuticos capazes de deter ou reverter essa cascata de eventos apresenta um grande potencial de impacto positivo no prognóstico da sepse. Até o momento, uma única droga resultante dessa abordagem foi aprovada para o uso clínico, a proteína C ativada recombinante (Bernard, *et al.*, 2001).

É nesse contexto que se insere o presente estudo, no qual buscamos estudar o potencial terapêutico da HO-1, e mais especificamente de um dos seus produtos, a biliverdina, na sepse.

Recentemente, alguns estudos publicados começaram a abordar essa questão utilizando, em quase sua totalidade, modelos de endotoxemia letal (Overhaus, *et al.*, 2006; Sarady-Andrews, *et al.*, 2005; Sarady, *et al.*, 2004; Sass, *et al.*, 2004). Tecnicamente simples e reprodutíveis, os modelos de endotoxemia são ferramentas úteis para o estudo de algumas vias efetoras da inflamação e dos danos provocados no hospedeiro pela sua ativação excessiva, como ocorre na SIRS (Buras, *et al.*, 2005). O fato de empregar apenas um dos vários ligantes de PRR descritos, no entanto, constitui uma das limitações desses modelos, já que a interação com microorganismos completos leva à ativação de conjuntos complexos de receptores que interagem entre si, modulando as respostas imunológicas (Trinchieri and Sher, 2007). Além disso, aspectos fundamentais como o impacto da virulência dos patógenos na evolução da doença e a capacidade do organismo de combater efetivamente a infecção frente a intervenções imunomodulatórias não

são abordados por esses modelos, o que limita a aplicabilidade dos resultados obtidos na sepse clínica (Marshall and Creery, 1998).

Neste estudo, utilizamos primariamente o modelo de CLP para indução de sepse experimental em camundongos. Esse modelo combina a presença de um foco infeccioso polimicrobiano (que inclui o amplo espectro de microorganismos presentes nas fezes) com a presença de tecido necrótico, características que se aproximam das observadas nas peritonites por apendicite ou diverticulite perfuradas em humanos. Dentre os modelos de sepse, a CLP é o que reproduz de forma mais fidedigna a sucessão de alterações hemodinâmicas, metabólicas e imunológicas observadas na sepse clínica. A presença de microorganismos viáveis permite a avaliação dos efeitos de intervenções sobre a resposta inflamatória e o controle da infecção simultaneamente (Buras, *et al.*, 2005; Hubbard, *et al.*, 2005). As infecções intra-abdominais são uma causa relevante de morbidade em UTI, particularmente nas unidades com uma alta proporção de pacientes em pós-operatório de emergência e politraumatizados. Nessa população, o desenvolvimento de sepse grave aumenta em 13 vezes o risco de morte, e a mortalidade ultrapassa os 50% nos casos recorrentes ou provocados por complicações cirúrgicas (Anaya and Nathens, 2003; Marshall and Innes, 2003). As características citadas fazem com que muitos autores considerem a CLP como o modelo experimental de sepse com maior relevância clínica, o que influenciou a nossa preferência por utilizá-lo em nossos experimentos.

Inicialmente, buscamos caracterizar o efeito da modulação da HO-1 sobre a mortalidade após a CLP. Para isto, tratamos os animais com SnPP ou CoPP, análogos sintéticos do heme, cuja diferença estrutural está na substituição do átomo central de ferro por estanho ou cobalto, respectivamente. Ao contrário do heme, essas moléculas não podem ser degradadas pela HO por não ligarem oxigênio molecular. A SnPP atua como um inibidor competitivo da HO, provocando rapidamente uma diminuição do catabolismo do heme, que é reversível após um período de 6 a 12 horas. Já o efeito predominante *in vivo* da CoPP é uma intensa e sustentada indução da HO-1, com pico em torno de 24 horas e que pode se prolongar por semanas após a administração de uma única dose (Kappas and Drummond, 1986; Shan, *et al.*, 2000).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com a SnPP torna os animais mais suscetíveis ao CLP, aumentando a mortalidade, enquanto que o tratamento com a CoPP resulta no efeito inverso (apesar de mais discreto), protegendo os animais. Uma abordagem semelhante já fora utilizada por Sass e cols., em um modelo de injúria inflamatória hepática (D-galactosamina/LPS), demonstrando-se proteção hepática e redução da mortalidade pelo tratamento com CoPP e agravamento da lesão hepática após o tratamento com a SnPP (Sass, *et*

al., 2004). Downard e cols., utilizando o modelo de CLP também observaram um aumento de marcadores de lesão hepática após o tratamento com a zinco protoporfirina, um inibidor da HO (Downard, *et al.*, 1997). Para documentarmos a extensão e eficácia do tratamento com a CoPP nos animais, medimos a expressão da HO-1 em órgãos distintos após 24 horas, que foi o intervalo estabelecido entre a administração da droga e a CLP. Os três órgãos avaliados apresentaram um aumento na HO-1, sendo esse efeito claramente mais intenso no fígado. Levando-se em conta a relevância fisiológica do fígado para o catabolismo do heme e à luz dos resultados mencionados, é interessante a sugestão de que esse órgão pode ser um mediador importante dos efeitos observados em estratégias de modulação sistêmica da HO-1.

Apesar dos efeitos protetores observados neste e em outros estudos após o tratamento com a CoPP, sua aplicabilidade como agente terapêutico em humanos é limitada por importantes parafeitos, que incluem alterações endócrinas (queda dos níveis séricos de testosterona e hormônios tireoidianos) e uma acentuada inibição de biotransformações dependentes do citocromo P-450 (Kappas and Drummond, 1986).

Nesse sentido, os produtos da HO, em particular a biliverdina, nos parecem candidatos mais atraentes para o uso clínico. Já se demonstrou em diversas situações experimentais que a administração de biliverdina, bilirrubina ou CO, isoladamente ou em associação, é capaz de substituir os efeitos da indução da HO-1 (Otterbein, Soares, *et al.*, 2003). As drogas disponíveis dirigidas para a elevação dos níveis da HO-1 são tóxicas, como a CoPP, ou envolvem sistemas complexos, como peptídeos transativadores transcricionais (TAT) (Ribeiro, *et al.*, 2003). Os sistemas de administração de CO disponíveis também apresentam aplicabilidade limitada: a via inalatória requer mensuração e titulação cuidadosas para que não sejam atingidas concentrações tóxicas; outras vias de administração requerem drogas ainda em fase experimental como as CO-RMs (do inglês *CO-releasing molecules* – moléculas liberadoras de CO) (Mottlerlini, *et al.*, 2005). Já a biliverdina e a bilirrubina são moléculas endógenas que podem, em princípio, ser administradas sem alterações. O potencial tóxico dessas substâncias, principalmente em adultos, parece ser menor que o do CO. A bilirrubina é normalmente conjugada ao ácido glicurônico nos hepatócitos, gerando um produto hidrossolúvel e atóxico que é excretado na bile e, quando em excesso, na urina (Dennerly, *et al.*, 2001). Mesmo elevações crônicas de bilirrubina não-conjugada de 2 a 3 vezes os níveis séricos normais (como ocorre na Síndrome de Gilbert, por um déficit na glicorunização da bilirrubina) são consideradas inofensivas (Lucas, *et al.*, 1997). Uma vantagem potencial da utilização da biliverdina sobre a bilirrubina é tirar proveito da via endógena de produção da bilirrubina pela BVR.

Pelos motivos descritos acima, optamos por concentrar os experimentos seguintes na terapia com a biliverdina. O regime terapêutico utilizado baseou-se no estudo de Sarady-Andrews e cols., onde demonstrou-se em um modelo de endotoxemia letal redução na mortalidade em ratos pré-tratados com biliverdina (Sarady-Andrews, *et al.*, 2005). Primeiramente utilizamos um modelo de endotoxemia com o objetivo de testar a reprodutibilidade desse efeito nos camundongos utilizados em nosso estudo. O resultado observado foi semelhante ao previamente descrito, com uma acentuada proteção observada no grupo tratado com a biliverdina.

Em seguida, passamos para estudos de mortalidade empregando o modelo de CLP. Utilizando um protocolo de três doses, que incluiu pré e pós-tratamento, administradas por via intraperitoneal, observamos uma redução na mortalidade dos animais tratados. Como a via intraperitoneal envolvia a injeção da droga diretamente sobre o sítio da infecção, administramos alternativamente o mesmo regime terapêutico por via subcutânea, obtendo resultados similares. Testamos ainda um terceiro protocolo com o objetivo de simular uma situação de maior relevância clínica, constituído de uma única dose administrada três horas após a CLP, excluindo, portanto, o pré-tratamento. O efeito observado foi uma tendência à redução da mortalidade, próxima ao nível de significância estatística. Desconhecemos estudos publicados até o momento que tenham demonstrado esse efeito protetor da biliverdina ou da indução da HO-1 no modelo de CLP. Esses resultados demonstram que o efeito protetor da biliverdina na sepse, sugerido pelos modelos de endotoxemia, se mantém em um modelo mais complexo e clinicamente relevante, que envolve um foco infeccioso. Além disso, esse efeito não depende da administração da biliverdina diretamente sobre o compartimento infectado, e possivelmente também ocorre mesmo quando o tratamento se inicia após a indução da sepse.

Para buscar os possíveis mecanismos responsáveis pela proteção observada, estudamos as características da resposta inflamatória no sítio da infecção, através da análise do lavado peritoneal dos animais. Como esperado após um estímulo infeccioso, o lavado peritoneal dos animais submetidos à CLP apresentou um número aumentado de leucócitos, refletindo principalmente um intenso recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Tem-se atribuído um papel dúbio aos neutrófilos na patogênese da sepse, pois ao mesmo tempo em que representam um elemento-chave no combate à infecção, sua ativação excessiva pode provocar danos significativos aos tecidos do hospedeiro, sendo causa de morbidade (Marshall, 2005). Nossos resultados demonstraram no lavado peritoneal colhido 24 horas após a CLP uma redução significativa no número de células mononucleares e neutrófilos no grupo tratado com a biliverdina. Esse efeito foi particularmente intenso sobre o número de neutrófilos e já se

manifesta mais discretamente como uma tendência, apesar de não significativa estatisticamente, no lavado peritoneal de 6 horas. A redução do acúmulo de neutrófilos após o tratamento com a biliverdina é uma característica frequentemente relatada nos estudos que testaram a biliverdina em modelos de inflamação. Sarady-Andrews e cols., no estudo já mencionado anteriormente, observaram uma redução no número de neutrófilos no lavado broncoalveolar em animais submetidos à endotoxemia ou CLP após o tratamento com a biliverdina (Sarady-Andrews, *et al.*, 2005). De forma correlata, Overhaus e cols. demonstraram uma redução na infiltração neutrofílica em cortes histológicos do intestino de ratos tratados com biliverdina e submetidos à CLP (Overhaus, *et al.*, 2006).

O recrutamento dos neutrófilos da corrente sanguínea para o sítio da infecção depende da ligação entre moléculas de adesão presentes nas superfícies do endotélio vascular e dos neutrófilos, cuja expressão é estimulada pelo processo inflamatório. A partir dessa ligação, os neutrófilos circulantes inicialmente rolam pela superfície endotelial até fixarem-se firmemente a esta, ao que se segue a transmigração através do endotélio para os tecidos subjacentes. Alguns estudos já estudaram o papel da biliverdina especificamente sobre esses processos. Hayashi e cols. estudaram o efeito da HO-1 sobre a interação entre leucócitos e o endotélio vascular *in vivo*. Nesse estudo, a indução da HO-1 reduziu a adesão de leucócitos ao endotélio após estímulos pró-oxidantes, e a administração de biliverdina, mas não de CO, reproduziu esses efeitos (Hayashi, *et al.*, 1999). Freitas e cols. obtiveram resultados semelhantes ao estudar o rolamento, adesão e migração de neutrófilos em um modelo de inflamação peritoneal induzida por carragenina. A indução de HO-1 ou tratamento com a biliverdina ou CO inibiram esses processos (Freitas, *et al.*, 2006).

Esses fenômenos podem ter determinado a redução no acúmulo de neutrófilos observada no presente estudo como uma tendência na fase mais precoce (6 horas) e de forma intensa em 24 horas, apesar de não estar claro se esse é um efeito direto da biliverdina ou um reflexo da resolução do processo inflamatório.

Normalmente, os neutrófilos circulantes tem uma meia vida de 6 a 10 horas, sofrendo apoptose após esse período (Marshall, 2005). Essa sobrevivência pode ser prolongada na presença de mediadores inflamatórios, o que já foi demonstrado na sepse (Matute-Bello, *et al.*, 1997). É interessante especular se o tratamento com a biliverdina poderia estar influenciando esse processo.

Além da celularidade, determinamos também os níveis de TNF- α , IL-6, KC e IL-10 no lavado peritoneal dos animais coletado 24 horas após a CLP. O TNF- α é um mediador central

para o estabelecimento da resposta inflamatória. Essa citocina é produzida principalmente por macrófagos, mas também por outros leucócitos e células endoteliais. Estímulos inflamatórios (em particular o LPS) provocam uma rápida liberação de TNF- α , que por sua vez induz uma série de eventos como o aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio e a produção de quimiocinas, resultando na migração de leucócitos para o sítio da infecção. Os efeitos sistêmicos mediados por essa citocina incluem a indução da produção de proteínas de fase aguda e febre. A administração de altas doses de TNF- α provoca alterações hemodinâmicas semelhantes às observadas no choque séptico, o que fez com que essa citocina fosse implicada na fisiopatologia da sepse (Cohen, 2002; Wajant, *et al.*, 2003). Observamos em nossos resultados uma redução significativa nos níveis de TNF- α no lavado peritoneal do grupo tratado com a biliverdina, o que demonstra uma redução na sinalização pró-inflamatória.

De forma condizente com esse resultado, observamos nos animais tratados com a biliverdina uma diminuição significativa nos dos níveis da quimiocina KC, caracterizada um análogo funcional murino da IL-8 humana (Bozic, *et al.*, 1994). A IL-8 (ou CXCL8) é uma quimiocina com um importante papel na regulação da resposta inflamatória aguda. Sua produção pode ser observada em uma ampla variedade de células, dentre as quais os macrófagos e monócitos representam a principal fonte. A secreção de IL-8 é induzida por estímulos que incluem citocinas, como o TNF e IL-1 ou bactérias e seus produtos. A elevação da concentração dessa quimiocina no sítio da infecção resulta em um gradiente quimiotático que é determinante para o recrutamento e ativação de neutrófilos (Remick and Ward, 2005). Portanto, os níveis reduzidos de IL-8 podem ter sido um dos fatores responsáveis pelo menor acúmulo de neutrófilos no lavado peritoneal após o tratamento com a biliverdina.

Outra citocina que se apresentou em níveis significativamente reduzidos foi a IL-6, que vem sendo caracterizada como um importante biomarcador na sepse. Essa citocina é produzida predominantemente por células do sistema imune em resposta à estímulos que incluem o TNF- α e IL-1. No entanto, a IL-6 possui uma cinética diferente, permanecendo detectável por períodos mais prolongados do que essas citocinas. Essas características tornam a IL-6 um marcador útil da atividade pró-inflamatória (Song and Kellum, 2005). Sua relevância na sepse já foi demonstrada tanto em modelos animais como em estudos clínicos que correlacionaram a elevação nos níveis plasmáticos de IL-6 a um pior prognóstico (Patel, *et al.*, 1994; Remick, *et al.*, 2002). O seu papel na fisiopatologia da sepse, entretanto, permanece ainda indeterminado. No presente estudo, a redução de IL-6 acompanhou a de mediadores pró-inflamatórios e correlacionou-se ao o grupo

que apresentou uma menor mortalidade, concordando com as características que vem sendo atribuídas a essa citocina na literatura.

Ao contrário dos demais mediadores aferidos, a IL-10 é uma citocina caracteristicamente antiinflamatória. A IL-10 é produzida por linfócitos T (Th2 ou CD8+), linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos, e células epiteliais. O TNF- α e o LPS são potentes estímulos para sua secreção. A ligação da IL-10 ao seu receptor celular ativa vias de sinalização que culminam na inibição da translocação nuclear de NF κ -B. O principal efeito resultante é a diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8, dentre outras (Scumpia and Moldawer, 2005). A produção endógena de IL-10 é um mecanismo contra-regulatório da inflamação cujo efeito na sepse pode ser variável. Pacientes sépticos apresentam uma correlação positiva entre os níveis séricos de IL-10 e de TNF- α (Marchant, *et al.*, 1995). Animais geneticamente deficientes de IL-10 apresentam uma resposta inflamatória exacerbada após a indução de endotoxemia (Berg, *et al.*, 1995). Por outro lado, a IL-10 é um mediador potencialmente envolvido na imunoparalisia que pode se estabelecer ao longo evolução da sepse (Oberholzer, *et al.*, 2002). Nossos resultados demonstraram uma redução, não significativa estatisticamente, nos níveis de IL-10 do lavado peritoneal do grupo tratado com a biliverdina. Esse dado sugere que a diminuição dos mediadores pró-inflamatórios não foi mediada pela IL-10. Alternativamente, poderia ter havido um aumento de IL-10 em um momento mais precoce, que não se encontrava mais presente nas 24 horas após a CLP, quando foi coletado o lavado peritoneal.

Ovehaus e cols. observaram uma diminuição nos níveis de IL-6 e um aumento na expressão de IL-10 no tecido intestinal de animais tratados com a biliverdina, coletado 3 horas após a CLP (Overhaus, *et al.*, 2006). De forma semelhante, Sarady-Andrews e cols. detectaram níveis reduzidos de IL-6 no plasma e tecido pulmonar e aumentados de IL-10 no plasma de animais tratados com a biliverdina, coletados 8 horas após a indução de endotoxemia (Sarady-Andrews, *et al.*, 2005). Possíveis motivos para a discordância parcial entre esses resultados e do presente estudo são as diferenças entre os materiais analisados, os intervalos de coleta e os modelos de sepse empregados. Podem existir diferenças consideráveis no padrão de secreção de citocinas entre modelos de endotoxemia e CLP, e mesmo entre modelos de CLP com diferentes intensidades do insulto inicial (Ebong, *et al.*, 1999; Remick and Ward, 2005). Além disso, o padrão de sinalização da imunidade inata pode variar entre diferentes órgãos e tecidos (Raz,

2007). No entanto, em ambos os estudos mencionados, o efeito resultante foi uma redução dos parâmetros inflamatórios analisados, o que se alinha com os nossos resultados.

O sucesso de terapias em modelos de sepse que empregam microorganismos viáveis, como a CLP, depende da capacidade de minimizarem-se os danos inflamatórios ao hospedeiro sem que se comprometa significativamente o controle da infecção (Esmon, 2004). Assim, seguindo-se à análise dos parâmetros inflamatórios, buscamos caracterizar os efeitos da terapia com a biliverdina sobre a eliminação bacteriana na cavidade peritoneal. Para tal, determinamos o número de UFC em culturas do lavado peritoneal coletado 6 e 24 horas após a CLP. Os animais tratados com a biliverdina apresentaram uma redução significativa no número de UFC das culturas do lavado peritoneal de 24 horas, o que já se manifestava como uma tendência, não significativa estatisticamente, no material de 6 horas. Esses resultados sugerem que o tratamento com a biliverdina resultou em uma eliminação bacteriana mais eficiente no sítio da infecção. Desconhecemos, até o momento, publicações que tenham abordado o papel da biliverdina ou quaisquer outras intervenções baseadas na HO-1 sobre o controle da infecção.

Uma suposição inicial foi a de que a solução injetada poderia estar provocando um efeito bactericida ou bacteriostático direto, particularmente porque o protocolo empregado em nossos experimentos envolvia a administração da biliverdina diretamente sobre o compartimento infectado. Essa hipótese foi testada através da incubação de *E. coli* em uma solução de biliverdina equivalente à administrada aos animais. Verificamos números semelhantes de UFC nas culturas das soluções de biliverdina e controle. Esse resultado sugere que a biliverdina influenciou a eliminação bacteriana na cavidade peritoneal de forma indireta.

O conjunto de resultados apresentado sugere um papel benéfico da indução da HO-1 e do tratamento com a biliverdina na sepse. Pela primeira vez, demonstrou-se que terapias baseadas na HO-1 podem alterar a sobrevivência de animais em um modelo que emprega um foco infeccioso. Esse efeito protetor parece estar acompanhado de uma resolução da inflamação e de uma eliminação bacteriana mais efetivos no sítio da infecção. Apesar de representar um avanço nas questões abordadas, acrescentado dados novos aos previamente descritos na literatura, o presente estudo possui limitações que merecem ser destacadas.

Alguns aspectos precisam ser explorados para permitir uma melhor inferência dos resultados a situações clínicas. O modelo de CLP utilizado empregou minimamente terapias adjuvantes, e seria interessante testar se a terapia com a biliverdina poderia resultar em um efeito protetor adicional ao observado pela administração de antibióticos. Além disso, na maioria dos experimentos os protocolos terapêuticos envolveram o tratamento dos animais previamente à

indução da sepse. Os experimentos de mortalidade em que o início do tratamento com a biliverdina se deu após a CLP envolveram a administração de apenas uma dose da droga e os resultados, apesar de demonstrarem uma tendência à redução da mortalidade, não foram estatisticamente significativos. Nesse sentido, seria necessária uma melhor caracterização da efetividade da terapia com a biliverdina após o estabelecimento da sepse. Observamos consistentemente em três experimentos consecutivos (n= 10 animais/grupo), uma menor mortalidade no grupo do pós-tratamento com a biliverdina, e a manutenção desse efeito em experimentos subseqüentes configuraria a significância estatística dos resultados. Pretendemos também empregar regimes de pós-tratamento com múltiplas doses, com o objetivo de verificar um possível impacto adicional sobre a redução da mortalidade.

Com relação às alterações observadas na resposta inflamatória, os níveis de citocinas no lavado peritoneal foram determinados 24 horas após a CLP, quando o efeito sobre o acúmulo de leucócitos já havia se estabelecido. Julgamos, portanto, necessária a obtenção de resultados em um momento mais precoce (como 6 horas) para uma melhor compreensão do fenômeno. Outro ponto importante é que os resultados deste estudo estão dirigidos ao sítio da infecção, e seria interessante estudar parâmetros de inflamação sistêmica (como os níveis de citocinas e proteínas de fase aguda no plasma) bem como marcadores de disfunção orgânica e hipoperfusão tecidual (como transaminases, creatinina e lactato séricos). Finalmente, é difícil determinar se as alterações nos parâmetros inflamatórios observadas no modelo de CLP se deram de forma independente ou foram secundárias ao melhor controle da infecção.

Os mecanismos responsáveis pela maior eliminação bacteriana observada nos animais tratados com a biliverdina permanecem incertos. Esse fenômeno já se manifestava como uma tendência 6 horas após a CLP, e nesse tempo o recrutamento de neutrófilos ainda não se apresentava comprometido de forma importante no grupo tratado com a biliverdina. Um efeito bactericida direto da solução de biliverdina nos parece improvável, pelos resultados observados no experimento de incubação com bactérias. A *E. coli* é uma bactéria prevalente nas fezes e, portanto, relevante para o modelo. No entanto, a microbiota fecal é constituída por um grande número de microorganismos, e não podemos descartar um possível efeito da biliverdina sobre outras espécies de bactérias. Além disso, como a biliverdina é rapidamente convertida à bilirrubina, torna-se necessário verificar adicionalmente um possível efeito dessa substância sobre o crescimento bacteriano.

Pouco se sabe a respeito das vias que medeiam os efeitos da biliverdina. A bilirrubina é um antioxidante, e um ciclo redox envolvendo a bilirrubina, biliverdina e BVR poderia

potencializar esse efeito (Baranano, *et al.*, 2002; Stocker, *et al.*, 1987). Portanto, a redução do estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos através dos quais a biliverdina atua. Além da sua função de redutase, a BVR vem sendo caracterizada como um fator de transcrição e uma quinase, estando envolvida na modulação de processos celulares (Maines, 2005). É interessante especular que a interação da biliverdina com a BVR poderia deflagrar esses mecanismos de ação da enzima.

6- CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que terapias baseadas na HO-1 podem ter efeitos benéficos na sepse. A indução farmacológica da HO-1 resultou na diminuição da mortalidade em um modelo experimental de sepse, enquanto que o tratamento com um inibidor desta enzima provocou o efeito inverso, reduzindo a sobrevida. A administração exógena da biliverdina, um produto da HO-1, também foi capaz de proteger animais submetidos a modelos de sepse experimental. Em um desses modelos, a CLP, o tratamento com a biliverdina resultou na redução de parâmetros inflamatórios acompanhada de uma eliminação bacteriana mais eficaz no sítio da infecção.

Com a evolução das pesquisas envolvendo a via de degradação do heme, novos conceitos emergem a respeito dos efeitos fisiológicos da HO-1 e seus produtos, bem como seu potencial terapêutico em uma ampla variedade de processos patológicos. Nesse contexto, os resultados deste estudo reforçam a sepse como um foco de interesse a ser explorado por estudos subsequentes.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anaya DA, Nathens AB. Risk factors for severe sepsis in secondary peritonitis. *Surg Infect (Larchmt)*. 2003 Winter;4(4):355-62.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7):1303-10.

Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, *et al*. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*. 1992 Sep 5;267(25):18148-53.

Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):16093-8.

Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, *et al*. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1200-5.

Barreiro E, Comtois AS, Mohammed S, Lands LC, Hussain SN. Role of heme oxygenases in sepsis-induced diaphragmatic contractile dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Aug;283(2):L476-84.

Beale SI, Yeh JI. Deconstructing heme. *Nat Struct Biol*. 1999 Oct;6(10):903-5.

Berberat PO, Dambrauskas Z, Gulbinas A, Giese T, Giese N, Kunzli B, *et al*. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3790-8.

Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Menon S, Davidson N, *et al*. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest*. 1995 Nov;96(5):2339-47.

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, *et al*. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001;344(10):699-709.

Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):257-63.

Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*. 1996 Jul;24(7):1125-8.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, *et al*. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992 Jun;101(6):1644-55.

Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* 1989 May;17(5):389-93.

Bozic CR, Gerard NP, von Uexkull-Guldenband C, Kolakowski LF, Jr., Conklyn MJ, Breslow R, *et al.* The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization. *J Biol Chem.* 1994 Nov 25;269(47):29355-8.

Bozza M, Soares MB, Bozza PT, Satoskar AR, Diacovo TG, Brombacher F, *et al.* The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur J Immunol.* 1998 Oct;28(10):3120-7.

Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, *et al.* Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet.* 2002 Jul 20;360(9328):219-23.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Oct;4(10):854-65.

Bywaters EG. 50 years on: the crush syndrome. *Bmj.* 1990 Dec 22-29;301(6766):1412-5.

Chen YH, Chau LY, Lin MW, Chen LC, Yo MH, Chen JW, *et al.* Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with angiographic restenosis after coronary stenting. *Eur Heart J.* 2004 Jan;25(1):39-47.

Clayton CE, Carraway MS, Suliman HB, Thalmann ED, Thalmann KN, Schmechel DE, *et al.* Inhaled carbon monoxide and hyperoxic lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Oct;281(4):L949-57.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):885-91.

Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2004 Mar;32(3):858-73.

Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med.* 2001 Feb 22;344(8):581-90.

Downard PJ, Wilson MA, Spain DA, Matheson PJ, Siow Y, Garrison RN. Heme oxygenase-dependent carbon monoxide production is a hepatic adaptive response to sepsis. *J Surg Res.* 1997;71(1):7-12.

Ebong S, Call D, Nemzek J, Bolgos G, Newcomb D, Remick D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun.* 1999 Dec;67(12):6603-10.

Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med.* 2004 May;32(5 Suppl):S219-22.

Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, *et al.* Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol.* 1999 Jul;1(3):152-7.

Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* 2000;2(13):1643-9.

Freitas A, Alves-Filho JC, Secco DD, Neto AF, Ferreira SH, Barja-Fidalgo C, *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br J Pharmacol.* 2006 Oct;149(4):345-54.

Fujii H, Takahashi T, Nakahira K, Uehara K, Shimizu H, Matsumi M, *et al.* Protective role of heme oxygenase-1 in the intestinal tissue injury in an experimental model of sepsis. *Crit Care Med.* 2003 Mar;31(3):893-902.

Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2001 Feb;13(1):114-9.

Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med.* 2006 Dec;32(12):2077.

Graca-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):4160-5.

Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, *et al.* Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res.* 1999 Oct 15;85(8):663-71.

Hayes MA, Timmins AC, Yau EH, Palazzo M, Watson D, Hinds CJ. Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: influence of treatment and relationship to outcome. *Crit Care Med.* 1997 Jun;25(6):926-36.

Hill M, Pereira V, Chauveau C, Zagani R, Remy S, Tesson L, *et al.* Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *Faseb J.* 2005 Dec;19(14):1957-68.

Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax.* 1998 Aug;53(8):668-72.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348(2):138-50.

Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction [see comments]. *Crit Care Med.* 1999;27(7):1230-51.

Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, Bland KI, *et al.* Cecal ligation and puncture. *Shock.* 2005 Dec;24 Suppl 1:52-7.

Hunter J. *A Treatise on the Blood, Inflammation and Gunshot Wounds.* 2 ed. London: James Webster; 1794.

Ichiyama T, Isumi H, Yoshitomi T, Nishikawa M, Matsubara T, Furukawa S. NF-kappaB activation in cerebrospinal fluid cells from patients with meningitis. *Neurol Res.* 2002 Oct;24(7):709-12.

- Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005;9 Suppl 4:S13-9.
- Jao HC, Lin YT, Tsai LY, Wang CC, Liu HW, Hsu C. Early expression of heme oxygenase-1 in leukocytes correlates negatively with oxidative stress and predicts hepatic and renal dysfunction at late stage of sepsis. *Shock*. 2005 May;23(5):464-9.
- Kappas A, Drummond GS. Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins. *J Clin Invest*. 1986 Feb;77(2):335-9.
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):816-25.
- Knight PR, Sreekumar A, Siddiqui J, Laxman B, Copeland S, Chinnaiyan A, *et al*. Development of a sensitive microarray immunoassay and comparison with standard enzyme-linked immunoassay for cytokine analysis. *Shock*. 2004 Jan;21(1):26-30.
- Kravets A, Hu Z, Miralem T, Torno MD, Maines MD. Biliverdin reductase, a novel regulator for induction of activating transcription factor-2 and heme oxygenase-1. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):19916-23.
- Lanahan A, Williams JB, Sanders LK, Nathans D. Growth factor-induced delayed early response genes. *Mol Cell Biol*. 1992 Sep;12(9):3919-29.
- Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21;91(13):5987-91.
- Lee TS, Chang CC, Zhu Y, Shyy JY. Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection. *Circulation*. 2004 Sep 7;110(10):1296-302.
- Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med*. 2002 Mar;8(3):240-6.
- Lerner-Marmarosh N, Shen J, Torno MD, Kravets A, Hu Z, Maines MD. Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 17;102(20):7109-14.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, *et al*. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003 Apr;31(4):1250-6.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
- Lucas R, Echtenacher B, Sablon E, Juillard P, Magez S, Lou J, *et al*. Generation of a mouse tumor necrosis factor mutant with antiperitonitis and desensitization activities comparable to those of the wild type but with reduced systemic toxicity. *Infect Immun*. 1997;65(6):2006-10.
- Maines MD. New insights into biliverdin reductase functions: linking heme metabolism to cell signaling. *Physiology (Bethesda)*. 2005 Dec;20:382-9.

Marchant A, Alegre ML, Hakim A, Pierard G, Marecaux G, Friedman G, *et al.* Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. *J Clin Immunol.* 1995 Sep;15(5):266-73.

Marino P. *Infection, Inflammation, and Multiorgan Injury. The ICU Book.* 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998.

Marshall J, Creery D. Pre-Clinical Models of Sepsis. *Sepsis.* 1998(2):187-97.

Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S99-106.

Marshall JC. Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med.* 2005 Dec;33(12 Suppl):S502-5.

Marshall JC, Innes M. Intensive care unit management of intra-abdominal infection. *Crit Care Med.* 2003 Aug;31(8):2228-37.

Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, 2nd, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, *et al.* Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Dec;156(6):1969-77.

Miralem T, Hu Z, Torno MD, Lelli KM, Maines MD. Small interference RNA-mediated gene silencing of human biliverdin reductase, but not that of heme oxygenase-1, attenuates arsenite-mediated induction of the oxygenase and increases apoptosis in 293A kidney cells. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17084-92.

Motterlini R, Mann BE, Foresti R. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005 Nov;14(11):1305-18.

Mumby S, Upton RL, Chen Y, Stanford SJ, Quinlan GJ, Nicholson AG, *et al.* Lung heme oxygenase-1 is elevated in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2004 May;32(5):1130-5.

Nakao A, Murase N, Ho C, Toyokawa H, Billiar TR, Kanno S. Biliverdin administration prevents the formation of intimal hyperplasia induced by vascular injury. *Circulation.* 2005 Jul 26;112(4):587-91.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock.* 2001 Aug;16(2):83-96.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med.* 2002 Jan;30(1 Suppl):S58-S63.

Otterbein L, Chin BY, Otterbein SL, Lowe VC, Fessler HE, Choi AM. Mechanism of hemoglobin-induced protection against endotoxemia in rats: a ferritin-independent pathway. *Am J Physiol.* 1997;272(2 Pt 1):L268-75.

Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995 Nov;13(5):595-601.

- Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol*. 1999 Apr;276(4 Pt 1):L688-94.
- Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol*. 2003 Aug;24(8):449-55.
- Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, Liu F, Song R, Usheva A, *et al*. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med*. 2003 Feb;9(2):183-90.
- Overhaus M, Moore BA, Barbato JE, Behrendt FF, Doering JG, Bauer AJ. Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating inflammatory mediators. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Apr;290(4):G695-703.
- Patel RT, Deen KI, Youngs D, Warwick J, Keighley MR. Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. *Br J Surg*. 1994 Sep;81(9):1306-8.
- Pellacani A, Wiesel P, Sharma A, Foster LC, Huggins GS, Yet SF, *et al*. Induction of heme oxygenase-1 during endotoxemia is downregulated by transforming growth factor-beta1. *Circ Res*. 1998;83(4):396-403.
- Ponka P. Cell biology of heme. *Am J Med Sci*. 1999 Oct;318(4):241-56.
- Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 30;94(20):10919-24.
- Raz E. Organ-specific regulation of innate immunity. *Nat Immunol*. 2007 Jan;8(1):3-4.
- Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock*. 2002 Jun;17(6):463-7.
- Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock*. 2005 Dec;24 Suppl 1:7-11.
- Rensing H, Bauer I, Datene V, Patau C, Pannen BH, Bauer M. Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med*. 1999 Dec;27(12):2766-75.
- Ribeiro MM, Klein D, Pileggi A, Molano RD, Fraker C, Ricordi C, *et al*. Heme oxygenase-1 fused to a TAT peptide transduces and protects pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jun 13;305(4):876-81.
- Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*. 2006 Apr;86(2):583-650.
- Ryter SW, Otterbein LE. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays*. 2004 Mar;26(3):270-80.
- Sales Jr J, David C, Hatum R, Souza P. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. *RBTI*. 2006;18(1):9-17.

Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D, Nakao A, Overhaus M, Ollinger R, *et al.* Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Dec;289(6):L1131-7.

Sarady JK, Zuckerbraun BS, Bilban M, Wagner O, Usheva A, Liu F, *et al.* Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *Faseb J.* 2004 May;18(7):854-6.

Sass G, Seyfried S, Parreira Soares M, Yamashita K, Kaczmarek E, Neuhuber WL, *et al.* Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury. *Hepatology.* 2004 Nov;40(5):1128-35.

Scott JR, Gray DK, Bihari A, Badhwar A, Zhang X, Shan P, *et al.* Heme oxygenase modulates small intestine leukocyte adhesion following hindlimb ischemia/reperfusion by regulating the expression of intercellular adhesion molecule-1. *Crit Care Med.* 2005 Nov;33(11):2563-70.

Scumpia PO, Moldawer LL. Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med.* 2005 Dec;33(12 Suppl):S468-71.

Shan Y, Pepe J, Lu TH, Elbirt KK, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Aug 15;380(2):219-27.

Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet.* 2004 Aug 7-13;364(9433):545-8.

Song M, Kellum JA. Interleukin-6. *Crit Care Med.* 2005 Dec;33(12 Suppl):S463-5.

Song R, Kubo M, Morse D, Zhou Z, Zhang X, Dauber JH, *et al.* Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Am J Pathol.* 2003 Jul;163(1):231-42.

Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Aug;84(16):5918-22.

Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzuki S, Kurokawa A. Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 1999 Jul;27(7):1262-4.

Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg.* 1973 Aug;178(2):117-22.

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007 Mar;7(3):179-90.

Tulis DA, Durante W, Liu X, Evans AJ, Peyton KJ, Schafer AI. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene delivery inhibits injury-induced vascular neointima formation. *Circulation.* 2001 Nov 27;104(22):2710-5.

Vallet B. Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? *Crit Care.* 2003 Apr;7(2):130-8.

VanderMeer TJ, Wang H, Fink MP. Endotoxemia causes ileal mucosal acidosis in the absence of mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock. *Crit Care Med.* 1995 Jul;23(7):1217-26.

Villar J, Maca-Meyer N, Perez-Mendez L, Flores C. Bench-to-bedside review: understanding genetic predisposition to sepsis. *Crit Care.* 2004 Jun;8(3):180-9.

Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, *et al.* Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev.* 2003 Sep;55(3):551-71.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):45-65.

Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1998 Mar;152(3):711-20.

Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, *et al.* Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest.* 1999 Jan;103(1):129-35.

Zegdi R, Perrin D, Burdin M, Boiteau R, Tenailon A. Increased endogenous carbon monoxide production in severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2002 Jun;28(6):793-6.

9- ANEXO (PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS)

10- ANEXO (PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA)