

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO DA INSUFICIÊNCIA RENAL
PROMOVIDA PELA SEPSE INDUZIDA PELO
MODELO CLP (*Cecal Ligation and Puncture*):
AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E DE PARÂMETROS
RENAIS E INFLAMATÓRIOS**

Viviane Gomes Portella

Belo Horizonte, 2010

VIVIANE GOMES PORTELLA

**DESENVOLVIMENTO DA INSUFICIÊNCIA RENAL
PROMOVIDA PELA SEPSE INDUZIDA PELO
MODELO CLP (*Cecal Ligation and Puncture*):
AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E DE PARÂMETROS
RENAIS E INFLAMATÓRIOS**

*Trabalho apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas - Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de doutora
em Ciências, na área de concentração de Fisiologia, sob orientação da
Profa. Dr^a. Maria Aparecida Ribeiro Vieira.*

Belo Horizonte, 2010

Portella, Viviane Gomes

Desenvolvimento da insuficiência renal promovida pela sepse induzida pelo modelo CLP (*Cecal Ligation and Puncture*): avaliação morfológica e de parâmetros renais. [manuscrito] / Viviane Gomes Portella. – 2010.

75 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Maria Aparecida Ribeiro Vieira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Insuficiência renal – Teses. 2. Septicemia – Teses. 3. Citocinas - – Teses. 4. Fisiologia – Teses. 5. Rins – Fisiopatologia – Teses. 6. Ligação e perfuração cecal – CLP. 7. Sepse. 8. Histomorfometria. I. Vieira, Maria Aparecida Ribeiro. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.466

Quando a febre é contínua, a superfície interna do corpo está fria e existe internamente uma grande sensação de calor e sede, a afecção é mortal ”

Hipocrates, 400 A.C.

Primeira descrição de sepse na história da medicina

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Maria Aparecida Ribeiro Vieira por confiar em mim me aceitando no doutorado, pela paciência, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo agradável convívio.

Ao Prof. Jamil Assreuy por seu conhecimento e disponibilidade em nos ajudar sempre.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia Renal, Ana Paula Araújo Ferreira Ribeiro, Roseli Martins Rezende Pereira, Priscila Elisa da Silveira, Lílian Fernanda Pacheco e Gustavo Cosenza pelas boas e muitas gargalhadas, companheirismo e amizade.

Ao Lúcio Ricardo Leite Diniz pelo companheirismo e por participar intensamente da minha vida nestes últimos quatro anos.

À Kátia Daniela da Silveira pelo enorme apoio no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade que construímos ao longo destes anos.

Aos Professores Jorge Luiz Pesquero, Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, Maria Aparecida Gomes pelo apoio com equipamentos e reagentes para execução deste trabalho, me recebendo sempre com muita gentileza e cordialidade.

Aos Laboratórios de Endocrinologia, Laboratório de Hipertensão, Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, Laboratório de Imunofarmacologia pela disponibilização de infra-estrutura e por sempre me receberem com simpatia e cordialidade.

Ao Prof. Geovanni Dantas Cassali do Laboratório de Patologia Comparada pelas orientações na avaliação histopatológica.

À Prof^a. Fabíola de Oliveira Paes Leme do Laboratório de Patologia Clínica - Escola de Veterinária – UFMG pelos ensaios da gama glutamil transferase.

À Adelaide por sempre tentar atender nossos pedidos de ratos feitos em cima da hora.

À secretaria da Pós-Graduação, em nome de Maria Célia da Silva Costa e Cintya Menezes Fonseca, pela competência nos serviços prestados aos alunos durante o curso.

Aos técnicos Darcy Ferreira Santos, José Roberto da Silva e José Eustáquio de Oliveira pela gentileza, atenção e simpatia de todos os dias.

Aos meus queridos amigos e aos colegas da pós-graduação pela troca de informações, amizade e convívio diário.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica pela ajuda prestada.

Aos meus pais, Célia e Luiz e aos meus irmãos, Wanderson, Uisney e Wladimir pelo amor, dedicação, compreensão, incentivo, confiança e pela intensa participação em todos os momentos de minha vida.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS

CARS - Síndrome da Resposta Inflamatória Compensatória

CH₂O livre – clearance de água livre

CLP - ligadura e perfuração do ceco

C_{osm} – clearance osmolar

EAO - Espécies Ativas de Oxigênio

ET-1 – endotelina 1

FEH₂O – fração de excreção de água

FEK⁺ - fração de excreção de potássio

FENa⁺ - fração de excreção de sódio

FSR – fluxo sanguíneo renal

FU – fluxo urinário

GGT – Gama glutamil transferase

GPI – Glicosil-fosfatidilinositol

HMG-I – Proteína do grupo de alta mobilidade

i.p. - intraperitoneal

ICAM – Moléculas de Adesão do tipo intracelular

IL - interleucina 1, 6, 8, 10, 12, 1β

I-NF – inibidor de fator de necrose

iNOS - óxido nítrico sintase induzida

IRA – Insuficiência Renal Aguda

LPS – Lipopolissacarídeos

LTA – Ácido lipoteicóico

MARS - Síndrome da Resposta Inflamatória Mista

mmHg - milímetros de mercúrio

MODS - Síndrome da Insuficiência de Múltiplos Órgãos

MPO - mieloperoxidase

NF-κB - fator nuclear da cadeia Kappa beta

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

NT – não-treinado

PAF - Fator Ativador Plaquetário

PAM - pressão arterial média

PAMP – Pathogen Associated Molecular Pattern

PGs - Prostaglandinas

PKC - proteína quinase C

PLC - fosfolipase C

PMN – Neutrófilos polimorfonucleados

PRP – Pattern Recognition Receptors

RFG – ritmo de filtração glomerular

s.c. – subcutâneo

SIRS - Resposta Inflamatória Sistêmica

TLR – receptors Toll-like

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TRAF – TNF receptor activated factor-6

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VCAM – Moléculas de adesão do tipo vascular

RESUMO

Neste trabalho, foi investigado o efeito da sepse a longo prazo, sobre o tecido renal, utilizando o modelo de sepse induzida por ligação e perfuração cecal (*cecal ligation and perforation*, CLP, 10 perfurações) em ratos. Após a indução da sepse, o aspecto morfológico bem como parâmetros da função renal e inflamatórios foram avaliados em diferentes tempos (dias 1, 5, 10, 15 e 20), ao longo de 20 dias. A sepse induziu uma queda drástica na PAS (CLP, $62,0 \pm 9,4$ mmHg; *Sham*, $122,0 \pm 10,7$ mmHg; Controle, $130,0 \pm 7,1$ mmHg) e o hematócrito apresentou-se aumentado (CLP, $54,0 \pm 0,7\%$; *Sham*, $44,0 \pm 0,3\%$; Controle, $44,0 \pm 0,5\%$), efeitos estes, observados apenas no 1º dia pós-indução. A sepse também produziu aumento das concentrações plasmáticas de uréia e de creatinina, com concomitante queda do RFG, da proteinúria, da excreção urinária de γ GT e do FU, com concomitante redução da densidade específica urinária. Esses efeitos já intensos e máximos no 1º dia pós-sepse, assim permaneceram até 20 dias. As frações de excreção de sódio e de potássio mostraram-se elevadas somente a partir do 5º dia pós-sepse ao passo que o *clearance* osmolar e de H₂O livre não foram significativamente afetados. Cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Masson evidenciam que a sepse afetou principalmente a estrutura glomerular sendo, as alterações morfológicas durante a instalação da doença renal (dias 1, 5, 10 e 15 após a indução da sepse), compatíveis com o quadro de glomerulonefrite. Alterações significativas não foram observadas nos ratos dos grupos Controle e *Sham*. A morfometria glomerular de ratos do grupo CLP apresentou diferença significativa dos demais grupos quanto ao diâmetro da cápsula de Bowman (CLP, $128,0 \pm 8,0$ μ m; *Sham*, $88,0 \pm 11,0$ μ m; Controle, $91,0 \pm 9,2$ μ m) e diâmetro do espaço de Bowman (CLP, $10,0 \pm 0,7$ μ m; *Sham*, $7,6 \pm 0,7$ μ m; Controle, $7,2 \pm 0,3$ μ m) enquanto que a morfometria tubular foi similar nos três grupos estudados e em todos os tempos avaliados. A análise do perfil inflamatório mostra que a sepse aumentou acentuadamente a atividade da MPO no 1º dia após a indução de sepse (em unidades relativas: CLP, $68,6 \pm 14,5$; *Sham*, $36,5 \pm 12,0$; Controle, $7,4 \pm 2,5$). Embora a sepse não tenha alterado o conteúdo renal de RNA mensageiro que codifica TNF α , em nenhum dos dias avaliados, o TNF α renal mostrou-se aumentado apenas no 1º dia pós-sepse (em pg/ml/mg: CLP, $216,0 \pm 63,8$; *Sham*, $97,6 \pm 53,0$; Controle, $89,9 \pm 45,8$) enquanto que, neste mesmo dia, o TNF α quase não pôde ser detectado na urina. Nos demais dias analisados, o TNF α renal estava bastante diminuído. Similarmente ao observado para o TNF α renal, a IL-6 renal já se encontrava elevada no 1º dia pós-sepse (em pg/ml/mg: CLP, $1086,8 \pm 193,9$; *Sham*, $946,8 \pm 298,6$; Controle, $441,5 \pm 135,4$). No entanto, esta citocina também se encontrava aumentada nos rins do grupo *Sham*, indicando que o procedimento cirúrgico, por si, já aumentava os níveis renais da IL-6. Nos demais dias analisados, os níveis de IL-6 renal estavam diminuídos de forma similar nos 3 grupos estudados. As razões urinárias de TNF α /Creatinina e IL-6/Creatinina mostraram-se significativamente aumentadas ao longo dos 20 dias pós-sepse. O TGF β 1 renal apresentou-se elevado somente no 20º dia após indução da sepse. Os nossos resultados mostraram que a sepse induzida pelo modelo CLP produz danos profundos na função renal acompanhada por alterações na estrutura glomerular e induzindo um processo inflamatório renal. Este quadro já se encontra instalado nas primeiras 24 h após a indução da sepse, o qual permaneceu igualmente afetado durante todo o período avaliado (20 dias).

ABSTRACT

We have investigated the sepsis long-term effect on the kidney using a cecal ligation and puncture model (CLP, 10 punctures) in rats. After sepsis induction, the renal morphological profile as well as renal and inflammatory parameters were evaluated at different times (days 1, 5, 10, 15 e 20) throughout the experiments (20 days). Sepsis greatly reduced systolic arterial pressure (CLP, 62.0 ± 9.4 mmHg; Sham, 122.0 ± 10.7 mmHg; Control, 130.0 ± 7.1 mmHg) and increased hematocrit (CLP, $54.0 \pm 0.7\%$; Sham, $44.0 \pm 0.3\%$; Control, $44.0 \pm 0.5\%$), only at the 1st day after sepsis induction. Sepsis also increased plasma urea and creatinine concentrations, with concomitant reduction in the glomerular filtration rate, total urine protein, urine γ GT, and urine flow, with concomitant decrease in the specific urine density. The effect were very pronounced and maximum even at the 1^o day and remained high all experiment long (20 days). Sodium and potassium fractional excretions were elevated only after the 5th day although osmolar clearance and free water clearance were unchanged by sepsis. Histological slices stained by Masson trichromic showed that sepsis affected mainly the glomerular structure and that morphological changes during the kidney disease installation (days 1, 5, 10 e 15 after sepsis induction) were characteristics of glomerulonefritis. No significant changes were observed in the Control and *Sham* groups. Sepsis greatly increased diameters of Bowman' capsule (CLP, 128.0 ± 8.0 μ m; Sham, 88.0 ± 11.0 μ m; Control, 91.0 ± 9.2 μ m) and Bowman space (CLP, 10.0 ± 0.7 μ m; *Sham*, 7.6 ± 0.7 μ m; Control, 7.2 ± 0.3 μ m) whereas tubular morphometry was not changed. Mieloperoxidase activity was promptly increased at the 1st day after sepsis induction (in relative units: CLP, 68.6 ± 14.5 ; *Sham*, 36.5 ± 12.0 ; Control, 7.4 ± 2.5). Although renal TNF α mRNA transcription was not affected, renal TNF α content was significantly increased only at the 1st day after sepsis induction (CLP, 216.0 ± 63.8 pg/ml/mg; Sham, 97.6 ± 53.0 pg/ml/mg; Control, 89.9 ± 45.8 pg/ml/mg) whereas urine TNF α was slightly detectable and gradually increased until the end of experiment. Renal TNF α remained very low in the following experimental days. Similarly, renal IL-6 was increased at the 1st day and renal IL-6 was very low in all three experimental groups under study. The urinary ratios TNF α /Creatinine and IL-6/Creatinine were significantly increased all experiment long (20 days). A sepsis-induced increase in the renal TGF β 1 was observed only at 20th after induction. Our data showed that CLP-induced sepsis severely impaired renal function and stimulated a renal inflammatory response in paralel with changes in the glomerular structure. This profile was established at 24 h after sepsis induction and remained unchangeable until the 20th day of observation.

1 JUSTIFICATIVA

A instalação do quadro de insuficiência renal aumenta muito a morbimortalidade, apesar da terapia renal substitutiva precoce (Brivet *et al.*, 1994; Bagshaw *et al.*, 2005). A insuficiência renal aguda, associada à sepse, determina um prognóstico extremamente reservado, com taxas de mortalidade de até 80% (Thijs e Thijs, 1998).

A sepse é uma síndrome de alta incidência no mundo inteiro e de alta mortalidade na maioria dos países. Vários estudos vêm sendo realizados para se conhecer sua fisiopatologia, a fim de prevenir as alterações que podem levar o paciente à morte.

Desta forma, a tendência é que tenhamos cada vez mais, ao longo dos anos, pacientes se recuperando do quadro de sepse. Segundo Sales Júnior *et al.* (2006), a campanha mundial de sobrevivência na sepse (*Survival Sepsis Campaign*), na qual as sociedades médicas, em todo o mundo, empregam abordagens rápidas, precoces e protocoladas das ações terapêuticas, deve ocorrer uma redução na mortalidade da sepse de 25% até 2010.

Porém, é importante lembrar que a mortalidade deve ser diminuída, mas os danos de vários órgãos, como os rins, no período pós-sepse ainda é uma realidade com alta incidência. Portanto, tais órgãos também devem ser alvo de estudos com o propósito, não só de garantir a sobrevivência do paciente à sepse, mas também de aumentar a sua sobrevida e a sua qualidade de vida.

Com o presente trabalho, visamos não só estabelecer as possíveis alterações renais que podem agravar o quadro do paciente séptico, mas principalmente acompanhar as alterações que estes possam sofrer no período pós-sepse. Isto poderá viabilizar condutas terapêuticas de forma mais precoce a fim de desacelerar uma possível perda da função renal ou mesmo evitá-la.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Sepses: Definição e Epidemiologia

A sepsis é uma síndrome clínica resultante da resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro a infecção, evoluindo nos casos desfavoráveis para o choque séptico, culminando com a disfunção de múltiplos órgãos (DMSO) (Rangel-Fausto *et al.*, 2005; Wenzel, 2002).

As definições atualmente empregadas consideram que a sepsis, sepsis severa e o choque séptico representam estágios evolutivos da mesma doença o que não significa necessariamente um aumento da gravidade do processo infeccioso e sim da gravidade da resposta sistêmica (Rangel-Fausto *et al.*, 2005).

Em 1991, na Conferência de Consenso feita pela *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine*, foram estabelecidos critérios para a classificação da sepsis e doenças similares (Tabela 1), as quais foram enquadradas como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Bone *et al.*, 1992). Além disso, ficou estabelecido que o termo sepsis deverá ser utilizado apenas nos casos onde a infecção é documentada, pois a SIRS pode ser causada por diversas outras injúrias (além da infecção por bactérias, vírus e fungos), consideradas como “estéreis”, tais como trauma, queimaduras, choque hemorrágico e pancreatite aguda (Beishuizen *et al.*, 1999).

Em 2001, nova Conferência Internacional de Definição de Sepsis foi realizada e nela recomendou-se a manutenção das definições de 1991 e a incorporação na categoria de sinais e sintomas, com intuito de melhorar a identificação e definição da síndrome séptica (Levy *et al.*, 2003; Cunneen e Cartwright, 2004).

Tabela 1: Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico, conforme estabelecido na Conferência de Consenso feita pelo *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine*, no ano de 1991.

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS): Conjunto de manifestações clínicas em resposta a agressão orgânica grave que ocorre necessariamente na ausência de infecção. Caracterizada pela presença de dois ou mais dos seguintes sintomas: temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$; frequência cardíaca >90 bpm; frequência respiratória >20 movimentos/minuto; leucometria $>12.000/\text{mm}^3$ ou $<4.000/\text{mm}^3$, ou ainda, presença de $>10\%$ de bastões.

Sepse: Situação em que há presença dos sinais e sintomas descritos acima (SIRS) secundários a um processo infeccioso.

Sepse Grave: Quadro de sepse associada à disfunção orgânica, tais como cardiovascular, respiratória, renal, hematológica e do sistema nervoso central.

Choque séptico: Sepse grave com hipotensão arterial e alteração perfusional refratárias à reposição volêmica adequada.

Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos : Presença de função alterada de órgãos em pacientes criticamente doentes que necessitam de suporte para manter a homeostase

Apesar do rápido progresso nos cuidados de saúde, nas últimas décadas, a incidência de sepse tem aumentado ao longo dos últimos setenta anos e, continua sendo a maior ameaça à vida de pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (Osuchowski *et al.*, 2006). Anualmente, em todo o mundo, ocorrem cerca de 18 milhões de casos de sepse grave (Niederman *et al.*, 1990; Rangel-Frausto, 2005).

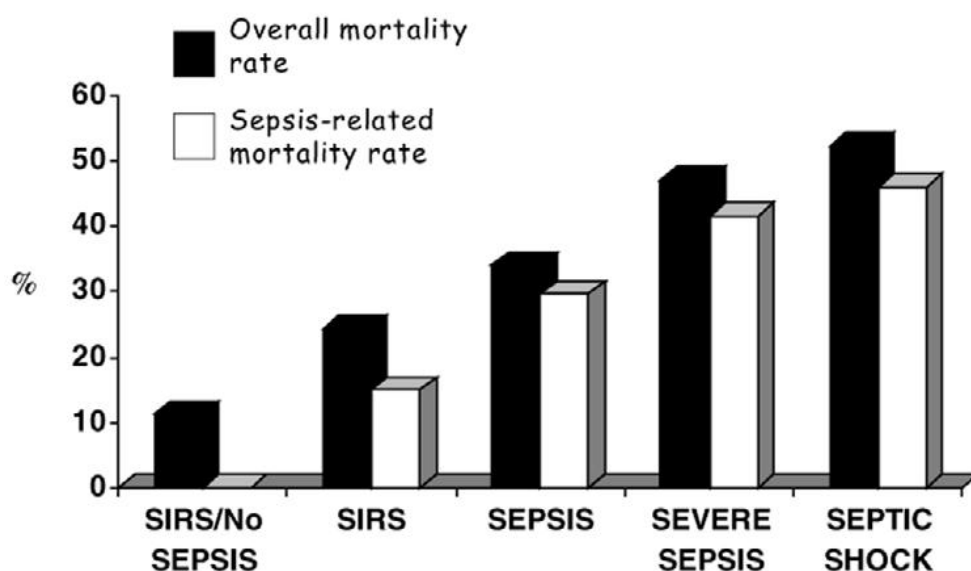
Nos Estados Unidos da América a sepse é a principal causa de morte entre os paciente de UTI (Hotchkiss & Karl, 2003). Angus *et al.* (2001), estimaram a incidência de sepse severa em 751.000 casos por ano nos EUA, correspondendo a 3 casos por 1.000 habitantes, sendo que 28,6% destes casos vão a óbito. Conforme Antonelli *et al.* (2007), o choque séptico é causa de 6,3 a 14,7% das admissões em UTI.

Na Europa 35% dos pacientes internados em UTI's apresentam quadro séptico em algum momento de sua estada, sendo que 27% morrem de sepse, valor que aumenta para 50% em pacientes com choque séptico (Vincent *et al.*, 2006).

No Brasil, como na América Latina em geral, dados consistentes sobre a incidência e desfecho dos casos de sepse são escassos. Um estudo realizado por Silva *et al.* (2004) sugere que a sepse é um grande problema nas UTIs do Brasil. No

estudo, a incidência de sepse ficou em torno de 57 casos por 1.000 pacientes/dia, correspondendo a 30,5% das admissões em UTI. A taxa de mortalidade dos pacientes em diferentes estágios como SIRS, sepse, sepse severa e choque séptico foi de 24,2%, 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente (Figura 1). A taxa de mortalidade global chega a 22%, sugerindo que a sepse é o maior problema de saúde pública em UTI's do país..

Figura 1. Taxa de mortalidade SRIS/Sepse avaliada pelo estudo BASES (Silva *et al.*, 2004) em cinco grandes centros de Terapia Intensiva no Brasil



(Extraído do estudo BASES, Silva *et al.*,2004)

Apesar de 20 anos de extensas pesquisas e desenvolvimento de numerosas terapias usadas em ensaios clínicos, os índices epidemiológicos continuam piorando (Rittirsch *et al.*, 2007). O aumento nas taxas de incidência e de morbimortalidade relacionadas à sepse nas últimas décadas, está diretamente relacionado aos avanços médicos obtidos nesse período, crescente número de pacientes imunodeprimidos, ao uso freqüente de procedimentos invasivos, a freqüência no uso de antibióticos (geração de mais microrganismos resistentes), além do aumento da expectativa de vida, que aumenta o número de pacientes idosos (Niederman *et al.*, 1990; Carvalho e Trotta, 2003; Rangel-Frausto, 2005).

Os custos para o tratamento da sepse já excedem o valor de U\$ 16 bilhões por ano nos EUA (Angus *et al.*, 2001). No Brasil, dados do estudo BASES (Brazilian

Sepis Epidemiological Study) mostraram que em 2003, os gastos com pacientes internados em UTI's somaram 17,34 bilhões de reais, o que representa de 30 a 35% dos gastos globais com a área de saúde (Andrade *et al.*, 2006). O Brasil tem entre 9 e 10 mil UTI's, e 25% dos leitos destas unidades são ocupadas por pacientes que desenvolvem sepse (Silva *et al.*, 2004).

A epidemiologia dos agentes etiológicos da sepse foi descrita em estudo realizado por Pol e Opal (2008) estes afirmam que embora até o início dos anos 1980, bactérias Gram-negativas fossem os principais microorganismos causadores da sepse, a incidência de Gram-positivas tem aumentado. Uma análise feita nos EUA no ano de 2000 indicou aumento da incidência de infecções Gram-positivas e fúngicas, onde 52,1% dos casos de sepse estão associados com bactérias Gram-positivas, 37,6% com Gram-negativas, 4,7% infecção polimicrobiana, 1% com bactérias anaeróbias e 4,6% de fungos (Poll e Opal, 2008).

2.2 Fisiopatologia da sepse

A sepse resulta de uma descompensação hemodinâmica decorrente de presença de agentes infecciosos e mediadores inflamatórios na circulação sangüínea, levando a má distribuição do fluxo sangüíneo na microcirculação. (Hollenberg *et al.*, 2004).

Historicamente, os sintomas da reposta séptica são decorrentes da resposta imune. Entretanto, estudos recentes sugerem uma complexa interação entre inflamação, coagulação e diminuição da fibrinólise ocorrem em resposta a um "gatilho" imune, por exemplo, a infecção bacteriana (Opal e Esmon, 2003). O início simultâneo desses três processos tem papel central na fisiopatologia da sepse e o prosseguimento destes pode desencadear disfunção endotelial e falência múltipla de órgãos culminando, se não houver tratamento, com óbito (Oberholzer *et al.*, 2000).

Os fatores desencadeantes da reposta inflamatória, por meio, da ativação celular e da cascata de eventos plasmáticos são principalmente os componentes da parede celular dos microorganismos, como o ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanos, derivados de bactérias gram-positivas (exotoxinas), ou o lipopolissacarídeo (LPS), no caso de bactérias gram-negativas (endotoxinas). O LPS e as exotoxinas são liberados normalmente durante a replicação da bactéria e ou

como consequência da sua morte, devido à lise da parede celular (Opal, 2007; Hallman *et al.*, 2001; Werling e Jungi, 2003).

Na presença do patógeno, dois componentes da resposta imune são ativados: o inato e o adquirido. A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa contra a infecção. Nela, uma grande variedade de patógenos são reconhecidos (de maneira inespecífica) e a resposta desencadeada pelo reconhecimento, é imediatamente realizada por substâncias solúveis humoral celular (incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células, células natural “killer”). Estas deflagram a resposta imune adquirida. Em contraste à resposta inata, a resposta imune adquirida é caracterizada pelo reconhecimento altamente específico de antígenos e pela capacidade do sistema de armazenar “memória imunológica”. A imunidade adquirida, mediada por linfócitos T e B, reconhecem com alta afinidade microorganismos através da combinação de receptores com estruturas da parede microbiana. (Bochud e Calandra 2003; Heeg e Dalpke, 2003).

Agindo de forma integrada e auto-regulada as respostas imune inata e adquirida, promovem não apenas o combate à invasão de microorganismos, mas também a limpeza dos restos teciduais, a diminuição da lesão celular na tentativa de evitar a sua morte. Orquestrando a remodelagem tecidual com proliferação celular e ação angiogênica, para o restabelecimento da matriz lesada promovendo a recuperação do hospedeiro, reduzindo a probabilidade de infecção secundária ou oportunista (Oberholzer *et al.*, 2000; Ayala *et al.*, 2003).

A resposta inata do hospedeiro às infecções causadas por fungos e bactérias é mediada inicialmente por neutrófilos e monócitos/macrófagos. Estas células expressam receptores (PRR, *Pattern Recognition Receptors*) capazes de reconhecer regiões específicas e conservadas (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Patterns*), presentes em uma grande variedade de microorganismos (Weigand, 2004). O LPS ativa as células fagocíticas através dos receptores *Toll-like* (TLR) complexado à proteína ligadora de LPS e CD14. Após ativação destes receptores ocorre o recrutamento de várias proteínas citoplasmáticas acessórias, tais como a proteína adaptadora MyD88 e o receptor para IL-1 associado à quinase (IRAK). O recrutamento destas proteínas acessórias causa auto-fosforilação das mesmas e, conseqüentemente, ocorre ativação do TNF-receptor *activated factor-6* (TRAF-6). Este, por sua vez, causa a ativação de várias proteínas, tais como p38, JNK e

IKK α/β , cujas ações convergem para a ativação do fator nuclear kappa beta (NF- κ B) (Sherwood, 2004). Citocinas pró-inflamatórias são liberadas na circulação sanguínea levando à ativação de células como neutrófilos, monócitos, macrófagos, plaquetas e células endoteliais (Figura 2). Aliado a isso, ocorre ativação de várias cascatas de proteínas plasmáticas como o complemento, a coagulação, o sistema fibrinolítico e de contato. Mediadores lipídicos como eicosanóides e fator de ativação plaquetária, bem como radicais de oxigênio e nitrogênio são produzidos e liberados (Beishuizen *et al.*, 1999; Zanetti *et al.*, 1992).

Atualmente, os papéis de alguns mediadores na patogênese da sepse, já estão bem esclarecidos. Estes mediadores podem induzir alterações profundas na fisiologia normal da vasculatura e dos órgãos. Apesar de alguns mediadores serem mais importantes que outros, é provável que mediadores dos microorganismos e do hospedeiro interajam sendo, sua ação conjunta, responsável pela patogênese da sepse (Cohen, 2004; Dinarello, 1997; Casey *et al.*, 1993;)

Dentre os mediadores envolvidos na gênese da sepse pode-se destacar:

- Citocinas e quimiocinas: A resposta sistêmica à infecção é mediada através de citocinas produzidas por macrófagos, que estimulam receptores específicos das células do sistema imunológico e de órgãos alvo. A citocinas interleucina 1beta (IL-1 β), IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) são eventos deflagrados precocemente neste processo. Estas citocinas estimulam a liberação de outros mediadores da resposta inflamatória como produtos derivados do ácido araquidônico (PGE₂, TXA₂), fator ativador de plaquetas (PAF), peptídeos vasoativos (bradicinina, angiotensina, peptídeo intestinal vasoativo, aminas como histamina e serotonina e uma variedade de produtos derivados do complemento) (Vincent, 2000)
- Óxido nítrico (NO): O aumento na modulação da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) leva a um aumento na produção de NO que, por sua vez, pode estar relacionado pelo menos em parte, com a hipotensão associada à sepse (Szabo, 1998). As primeiras evidências de que o NO teria um envolvimento na fisiopatologia da sepse vieram com a descoberta de elevados níveis de nitrato (NO₃) e nitrito (NO₂) em pacientes sépticos (Ochoa *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1993). Aliado a isso, a redução no tônus

vascular vista após a administração de endotoxinas ou citocinas pró-inflamatórias, e a identificação do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) como NO, levaram às sugestões de que esta molécula estaria envolvida nas alterações cardiovasculares que ocorrem no choque séptico (Vincent *et al.*, 2000). Nas duas últimas décadas, tornou-se evidente que, na patogênese da sepse, o NO pode atuar de maneira deletéria ou benéfica. Embora conhecidas as suas propriedades vasodilatadoras, seus efeitos pró- e antiinflamatórios, bem como oxidantes e antioxidantes, entre outros, têm sido motivo de discussões e controvérsia (Hauser *et al.*, 2005).

- Espécies reativas de oxigênio (ERO), recentemente tem-se identificado as ERO como mediadores de diversas fases do dano celular e ativação de células imunes durante a sepse (Zhang *et al.*, 2000).
- Proteínas do grupo de alta mobilidade I (HMG-I): recentemente, identificou-se esta proteína estrutural da cromatina como um dos possíveis mediadores envolvidos na mortalidade induzida pela sepse (Wang *et al.*, 1999).

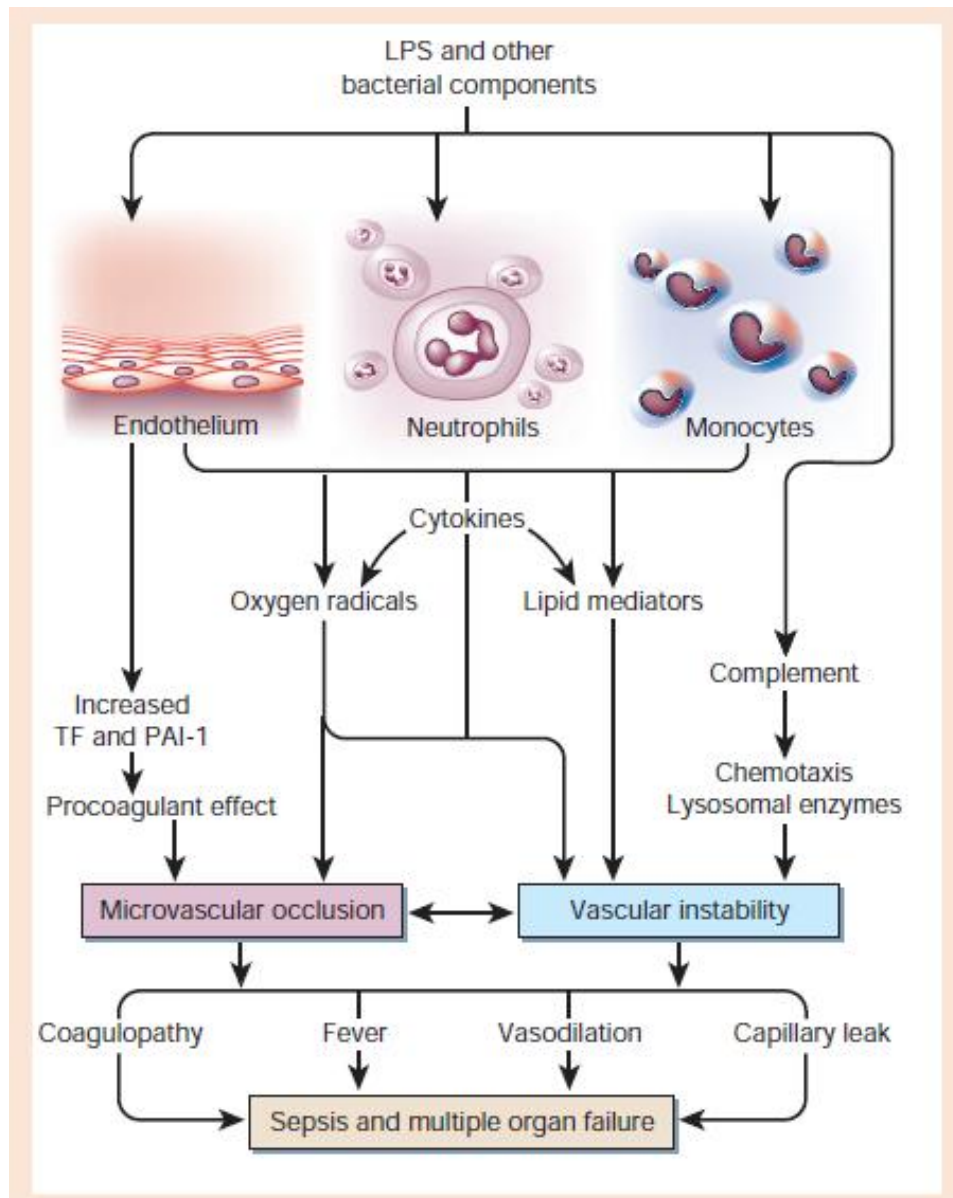


Figura 2. Resumo da patologia da sepse. Extraído de Cohen, 2004

A interação dos diversos mediadores leva à depressão miocárdica, alteração da função vascular e dano em órgãos-alvo (principalmente fígado, rins, pulmões e sistema nervoso central). A principal consequência desta resposta inflamatória é o comprometimento hemodinâmico, levando a síndrome da insuficiência de múltiplos órgãos (MODS), que é caracterizada por uma alta mortalidade. Para ser efetiva, a terapia farmacológica na sepse e SIRS, deve mimetizar e compensar a defesa natural do organismo com o objetivo de bloquear a resposta inflamatória o mais rápido possível (Parrilo, 1993).

Os mediadores secundários são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, formando um ciclo vicioso inflamatório (Bone, 1991). Estudos recentes mostram que pacientes com sepse apresentam características consistentes com imunossupressão, incluindo inabilidade para combater infecções e uma predisposição a infecções nosocomiais (Hotchkiss & Karl, 2003).

Uma razão para a falha das estratégias anti-inflamatórias, em pacientes com sepse, pode ser as mudanças que ocorrem na síndrome durante todo o tempo. Tem sido postulado que a resposta imune na sepse representa a interação entre dois fenômenos contrastantes no *status* inflamatório do paciente. No início, a SIRS é caracterizada por excessiva produção de mediadores inflamatórios (*status* hiperinflamatório) que é, então, progressivamente suprimida pelo desenvolvimento de uma resposta antiinflamatória (*status* hipo-inflamatório), a síndrome da resposta inflamatória compensatória (CARS). Entre estes dois momentos, ocorreria a síndrome da resposta inflamatória mista (MARS), representando uma homeostase temporária entre o declínio da SIRS e ascensão da CARS (Russel, 2006). Porém, Osuchowski *et al.* (2006) evidenciaram que a resposta inflamatória é dinâmica e que as citocinas não apresentam um comportamento linear, havendo presença tanto de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), como de citocinas antiinflamatórias (IL-10) e modulação por antagonistas (IL-1Ra) na fase inicial da sepse.

Paralelamente o estímulo antiinflamatório fisiológico irá propiciar um equilíbrio destes mediadores promovendo a sobrevida ao paciente. No entanto, se houver um desequilíbrio destes mediadores, a evolução da sepse será para choque, falência múltipla dos órgãos e morte.

Resumidamente, podemos afirmar que a patogênese da sepse é atribuída a processo inflamatório com resposta inflamatória inicial (Pinsky, 2000). Fazem parte das citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, interferon γ (IFN γ) e a proteína 1 monocitária (MCP-1), que funcionam como mediadores do sistema imune (Lowry, 1993; Sikora *et al.*, 2001; Abbas e Lichtman, 2005). Eles iniciam efetivamente o processo inflamatório contra a infecção. TNF α , IL-1, IL-6 são responsáveis por elevação de proteínas na fase aguda inflamatória, que inclui a proteína C reativa (PCR) durante a infecção. O aumento do nível sérico destas citocinas e IFN γ tem sido correlacionada com a gravidade e mortalidade no curso da sepse (Sikora *et al.*, 2001).

A excessiva produção destes mediadores promovendo estado hiperinflamatório pode conduzir o paciente a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, choque, falência múltipla de órgãos e morte (Koch, 1998; Oberholzer *et al.*, 2000; Netea *et al.*, 2003, Cinel & Opal, 2009). No entanto, a resposta antiinflamatória excessiva resulta na supressão da resposta imune (Loise *et al.*, 2003).

A sepse ativa também a produção e elevação de citocinas antiinflamatórias específicas.

A IL-10 é produzida por macrófagos e células dendríticas e esta envolvida no controle da reação imune inata. Ela inibe a função do macrófago, caracterizando-se como exemplo clássico de feedback negativo, pois inibe a própria célula que a sintetiza. Inibe ainda outras citocinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-8, ela própria IL-10, IL-12, IFN γ e TNF α (Abbas e Lichtman, 2005).

Assim como as citocinas pró-inflamatórias, elevado nível sérico de IL-10 tem sido correlacionado com o pior prognóstico na sepse. Sugerindo que a superprodução pode ser maior preditor de óbito (Derx *et al.*, 1995; Gogos *et al.*, 2000)

Portanto, o equilíbrio entre os efeitos das citocinas pró e antiinflamatórias determina a manutenção da homeostase preservando a função vital do organismo (Ng *et al.*, 2003)

2.3 Disfunção Renal e Sepses

A Insuficiência Renal Aguda (IRA) é definida como uma síndrome caracterizada pela incapacidade do rim em excretar escórias nitrogenadas e manter o equilíbrio hidroeletrólítico, instalando-se num período variável de horas a dias (Thadhani, 1996). Nos últimos anos, tem-se observado um aumento na incidência de IRA hospitalar (UTI), chegando a 7% das internações hospitalares em alguns estudos (Nasch, 2002). Em estudos recentes Liangos e cols (2006) mostraram que a ocorrência de IRA está relacionada com maior mortalidade hospitalar, tempo de internação e necessidade de suporte pós hospitalização.

Apesar de muitos avanços no tratamento da IRA, a mortalidade permanece em torno de 50% na maior parte dos estudos realizados oscilando de 30% a 90% dependendo da população analisada (Mendonça, 2000; Uchino *et al.*, 2005).

A sepse é a principal causa de insuficiência renal aguda (IRA) (Rangel *et al.*, 1995), principalmente, no ambiente de terapia intensiva. Até 50% dos pacientes com IRA apresentam sepse isoladamente ou associada a outros fatores de risco. Por outro lado, na população de pacientes sépticos, a prevalência de IRA é de até 40%, conforme os critérios adotados para a sua classificação. Num estudo prospectivo, a incidência de IRA foi de 19% em pacientes sépticos, de 23% naqueles com sepse grave e de 51% em pacientes com choque séptico (Rangel *et al.*, 1995).

Em estudo mais recente Bellomo e col (2006) relataram que a incidência de IRA em UTI varia de 1 a 25%. Destacando-se a sepse como principal fator etiológico, responsável por até 50% dos casos (Bagshaw *et al.*, 2007) com taxas de mortalidade de 30 a 90% (Scherier e Wang, 2004). Neste âmbito a sepse faz parte do contexto maior da Síndrome de Disfunção Múltipla dos Órgãos, acometendo pacientes graves e complexos, submetidos a um número cada vez maior de procedimentos invasivos (Uchino *et al.*, 2005).

Alguns autores descrevem uma queda na mortalidade dos pacientes com IRA. Em estudo recente, Waikar e cols avaliaram mais de cinco milhões de pacientes com IRA hospitalar num período de 15 anos, observando redução na mortalidade entre 1988 e 2002, o que não retira a possibilidade destes pacientes apresentarem cronicidade da doença renal.

O conhecimento íntimo do mecanismo molecular causador da IRA na sepse tem tido um importante avanço. O reconhecimento das endotoxinas pelas células-alvo ocorre através do receptor CD14. O passo inicial das reações desencadeadas pelos lipopolissacarídeos (LPS) necessita que ele se ligue à proteína carreadora do LPS (LPS-binding protein, LBP) que irá interagir com o glicosil-fosfatidilinositol (GPI) que ancora o CD 14 na membrana celular dos neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Esta interação do complexo LPS-LBP com mCD14 (CD14 de membrana) provoca a fosforilação do complexo: fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) com seu inibidor (I – NF). Esta fosforilação libera deste complexo, o I – NF, permitindo que o NF - $\kappa\beta$ seja translocado para o núcleo celular. No núcleo, ela se liga a seqüências específicas nas regiões promotoras de diversos genes. Número substancial de genes tem sido descrito como alvo do NF- $\kappa\beta$, sendo responsáveis pelo código inicial e pela transcrição de várias citocinas e quimiocinas como, por exemplo, o TNF- α , o PAF, LTs e PGs. IF- γ , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, etc. Estes, quando liberados para a

circulação sistêmica, causa desbalanço significativa da hemodinâmica, bem como disfunção celular e de órgãos que resulta em apoptose/necrose e, assim, podendo induzir a morte do organismo (Camusi *et al.*, 1998).

Outra via importante é quando o mCD14 é deslocado do GPI de membrana, sendo liberado na circulação como fator sérico (sCD14). O sCD14, ao ligar-se com o LPS, irá estimular outros tipos celulares como, por exemplo, células endoteliais e epiteliais, incluindo as células renais. Estas células, além de liberarem os fatores citados anteriormente, citocinas e quimiocinas, também são capazes de estimular a formação de moléculas de adesão do tipo vascular (VCAM) ou intercelular (ICAM), bem como seletinas. Estas proteínas são responsáveis pela adesão de polimorfonucleares às células endoteliais, iniciando o processo inflamatório, como o aumento de permeabilidade vascular, o que permite aumento da saída do fluido do espaço intravascular para o interstício, causando contração deste volume e hipotensão. Ao lado destas alterações, no túbulo renal, modificações destas moléculas induzem perda de adesão célula-célula ou célula-substrato (membrana basal tubular) com desprendimento e necrose destas células, com formação de cilindros intratubulares que podem obstruir os túbulos e contribuir para a perda da função (Camusi *et al.*, 1998).

Os mecanismos envolvidos na progressão das doenças renais, desde a injúria até a fibrose cicatricial, ainda não foram totalmente elucidados. Independente da causa primária da doença, o padrão histológico comum às nefropatias crônicas inclui o desenvolvimento de glomeruloesclerose e de lesão tubulointersticial. De acordo com o mecanismo, pode-se dividir o insulto inicial em imunológico e mecânico ou hemodinâmico. Após a lesão, seguem-se os passos intermediários, fundamentais à propagação e cronificação do processo (Mackenzie *et al.*, 1998). O mecanismo proposto de progressão da lesão renal está esquematizado na Figura 3.

O processo de inflamação e fibrose, que resulta dessa cascata de eventos, tem como principal consequência a perda de um grande número de néfrons. Os néfrons remanescentes tentam compensar a perda de função, aumentando a taxa de filtração. A lesão hemodinâmica glomerular é considerada a principal promotora e perpetuadora da esclerose glomerular, apesar de eventos ligados à hipertrofia do glomérulo também participarem do processo. Esse mecanismo de adaptação

mantido ao longo do tempo é responsável pela lesão renal progressiva (Hostetter *et al.*, 2001).

No início do século XXI ainda busca-se uma compreensão melhor da sepse. Pesquisas visando estabelecer a fisiopatologia da sepse, vem sendo desenvolvidas há alguns anos. Principalmente, tentando estabelecer a participação dos mediadores inflamatórios, que parecem ser os principais reponsáveis por alterações vasculares e hemodinâmicas, que levam a Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (Bernard *et al.*, 2001).

Não se pode negar avanços em relação ao diagnóstico mais precoce, rastreamento microbiano mais eficaz, que possibilita o rápido início do tratamento, o uso mais otimizado das variáveis hemodinâmicas e das técnicas de suporte orgânico. Avança-se também para um controle metabólico mais eficaz, compreendendo a importância do controle glicêmico, diagnosticando e tratando mais freqüentemente a insuficiência adrenal relativa. A teoria, a utilização da ventilação mecânica e terapia nutricional estão igualmente mais bem administrados ao paciente grave. Surgem freqüentemente novas medicações que visam interferir na cascata inflamatória e da coagulação (Bernard *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2005)

Desta forma, com o aumento dos pacientes que sobrevivem a esta patologia, principal objetivo a campanha mundial de sobrevivência na sepse (*Survival Sepsis Campaign*), deve ocorrer uma redução na mortalidade da sepse de 25% até 2010 (Sales Júnior *et al.*, 2006). Portanto, hoje precisamos ter a preocupação de não só tentar conhecer bem a fisiopatologia da sepse, para oferecer um melhor tratamento e maior probabilidade de sobrevivência dos pacientes. Mas, também procurar conhecer seqüelas do quadro séptico, que também podem e comprometem a vida do paciente.

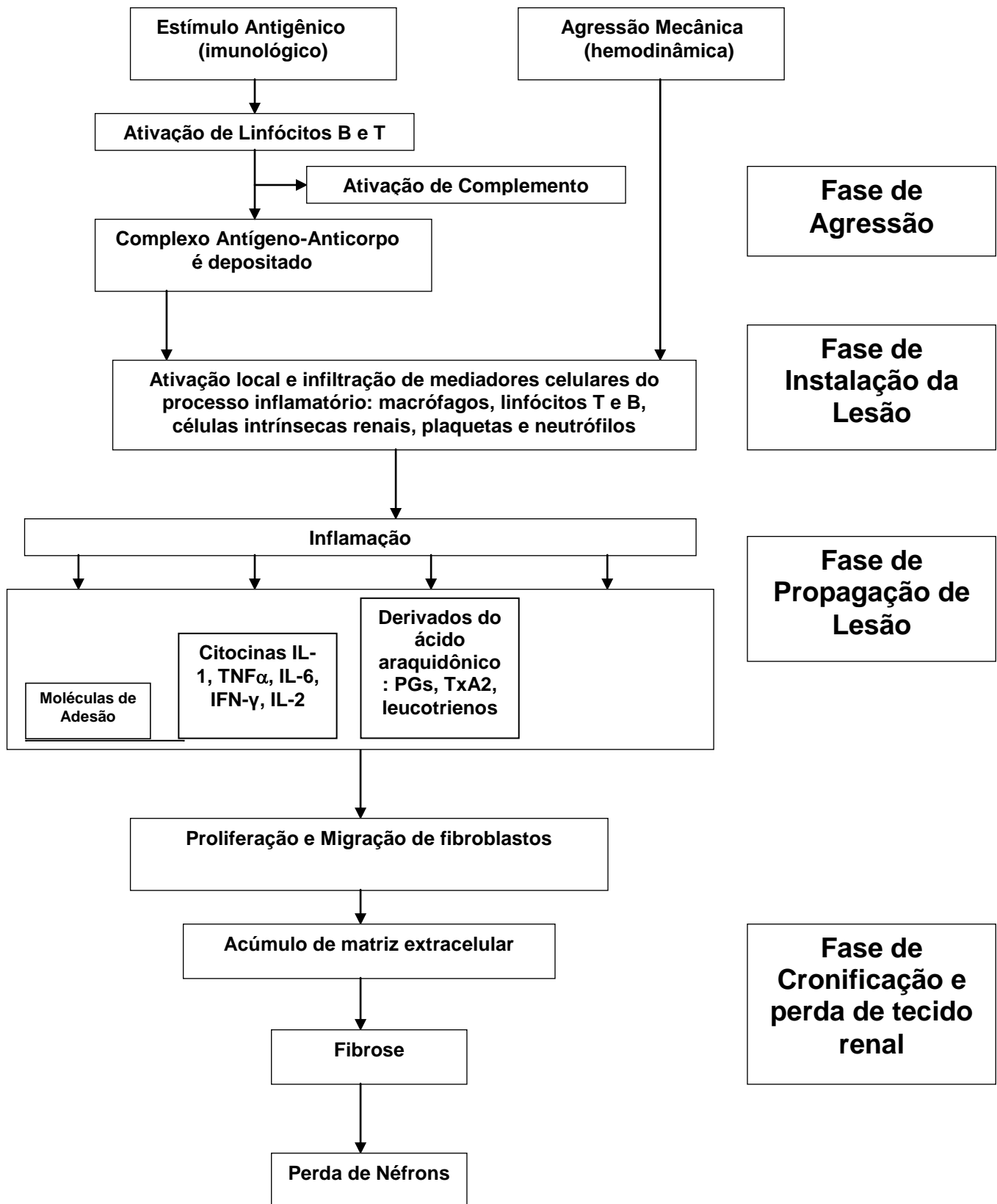


Figura 3. Esquema de propagação da lesão renal. A lesão foi dividida em agressão, instalação, propagação e cronificação. O evento final, a perda dos néfrons, resulta em nova agressão mecânica levando à perpetuação do processo.

2.4 Modelo CLP (*cecal ligation and puncture*)

O modelo de injúria com liberação da flora bacteriana é o que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos, decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. Nesse modelo, após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (Brooks *et al.*, 2007).

Apesar desse modelo experimental estar mais próximo a um quadro clínico e, por isso, ser um modelo mais adequado para o estudo da sepse, a maioria dos estudos em sepse experimental baseia-se em modelos nos quais a bactéria ou o LPS são administrados i.v ou i.p. Dados da literatura mostram que a patogênese da sepse, causada pela administração de LPS ou de bactérias i.v., difere daquela induzida por um foco infeccioso, como acontece em uma peritonite (Baggy *et al.*, 1991). A diferença dos resultados obtidos entre esses modelos é devido à quantidade do estímulo, ao local de indução e à forma de administração (em *bolus* ou liberação gradativa), induzindo uma cinética distinta de liberação dos mediadores inflamatórios (Walley *et al.*, 1996). A partir desses fatos, a utilização do modelo CLP para o estudo da sepse, descrito inicialmente por Wichtermann *et al.*, (1991), e Baker *et al.*, (1983), apresenta maior relevância para a compreensão da evolução da doença.

A intensidade dos danos causados pela sepse induzida pelo modelo CLP é determinada pelo número de perfurações realizadas e pelo diâmetro da agulha utilizada. Estudos sugerem que a resposta do grupo submetido à sepse letal aparece, primariamente, desenvolvendo um maior estresse oxidativo e causa uma mortalidade alta, em torno de 90%, em 10 dias (Andrades *et al.*, 2005).

Kuhlmann e col (1994) sugerem que a sepse pode ser classificada quanto a sua gravidade utilizando-se a taxa de mortalidade do grupo experimental estudado. Desta forma, para obtenção de uma sepse branda ou não letal (0-10% de mortalidade), moderada ou sub-letal (40-60% de mortalidade), e grave ou letal (90-100% de mortalidade), para que assim seja avaliada a correlação entre gravidade da sepse e os efeitos citotóxicos decorrentes desta patologia.

De acordo com Hollenberg *et al.* (2001) atualmente houve uma modificação no modelo da CLP para que se possa simular de melhor forma as características clínicas dos pacientes com sepse abdominal, e esta modificação refere-se à introdução da ressuscitação volêmica e a utilização de antibióticos de amplo espectro e para evitar a formação de abscesso pericecal, diminuindo agressividade da sepse, o que facilita realização de estudos a longo prazo.

3 OBJETIVOS

Avaliar o efeito, a longo prazo (20 dias), da sepse induzida pelo modelo CLP (*Cecal Ligation and Puncture*) sobre parâmetros da função renal, sobre o aspecto morfológico renal e sobre o desenvolvimento do processo inflamatório renal.

3.1 Objetivos Específicos

Avaliar, em diferentes momentos, durante 20 dias se a sepse induzida pelo modelo CLP promove:

- mudanças na ingestão de água e peso corporal;
- alterações na função renal;
- alterações na pressão arterial sistólica (PAS);
- alterações histológicas e morfométricas no rim;
- alterações nos níveis plasmático, renal e urinário de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos Wistar, machos, com peso entre 200 e 250g foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os ratos foram mantidos em ciclo claro-escuro de 10 – 12 h, com livre acesso à água e ração.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo n° 178/8).

4.2 Modelo Experimental

4.2.1 Indução de Sepse por Ligadura e Perfuração do Ceco (CLP)

A indução de sepse foi realizada pelo modelo CLP (*Cecal Ligation and Puncture*). Os ratos foram anestesiados com uma solução anestésica de cetamina 10% (15mg/Kg) e xilazina 2% (7,5mg/Kg) por via intraperitoneal.

Após a realização de tricotomia na região abdominal, os ratos foram colocados em mesa cirúrgica. A assepsia local foi feita com álcool iodado. Os ratos foram, em seguida, submetidos a uma laparotomia com incisão longitudinal de, aproximadamente, 1 cm e subsequente exposição do ceco. Este foi semi-ocluido com fio de seda, na região próxima à válvula íleocecal. O ceco recebeu dez ou vinte perfurações com agulha estéril (40 x 12) e, logo após, foi levemente comprimido para extravasamento do conteúdo fecal. Em seguida, o ceco foi recolocado na cavidade peritoneal, a qual foi suturada com fio de seda. Posteriormente, a musculatura e pele também foram suturadas e a região abdominal foi assepsiada com álcool. Os ratos receberam hidratação com 2 ml de solução fisiológica, por via subcutânea, para reposição de fluido (Benjamin *et al.*, 2001).

Para a recuperação, os ratos foram colocados em uma caixa devidamente aquecida, para retorno da anestesia, o qual levava de 60 a 120 min. Os ratos “falso” operados ou *Sham* foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos não sofrendo, contudo, semi-oclusão e perfurações no ceco.

Duas curvas de sobrevivência foram construídas em 2 grupos de ratos que receberam diferentes números de perfurações cecais: i) *Vinte perfurações*: nesse grupo, a taxa de mortalidade foi de 50% em 48 h e ii) *Dez perfurações*: nesse grupo, a taxa de mortalidade foi de 25% em 48 h. A curva de sobrevivência dos ratos submetidos ao modelo de sepse (CLP) e de ratos falso-operados (*Sham*) está representada na Figura 3. A sobrevivência no grupo que recebeu 10 e 20 perfurações cecais foi de 75% e 50%, respectivamente.

Várias seqüências de cirurgia, cada uma com 10 ratos, foram realizadas até se conseguir reprodutibilidade da taxa de sobrevivência. Nenhum dos ratos falso-operados (grupo *Sham*) morreu durante o período de avaliação.

Além da sobrevivência também foram observados os sinais clínicos de instalação de uma resposta inflamatória sistêmica como piloereção, tremores, sangramento ocular, prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação. Como foram sinais intensos, os mesmos foram facilmente identificados nos ratos do grupo CLP, mas não nos do grupo *Sham*.

A construção das curvas foi feita a partir da observação dos ratos em intervalos de 12 h, durante dois dias. Ao término dos experimentos, os ratos sobreviventes foram sacrificados sob anestesia com cetamina 10% (15 mg/Kg) e xilazina 2% (7,5 mg/Kg), por via intraperitoneal.

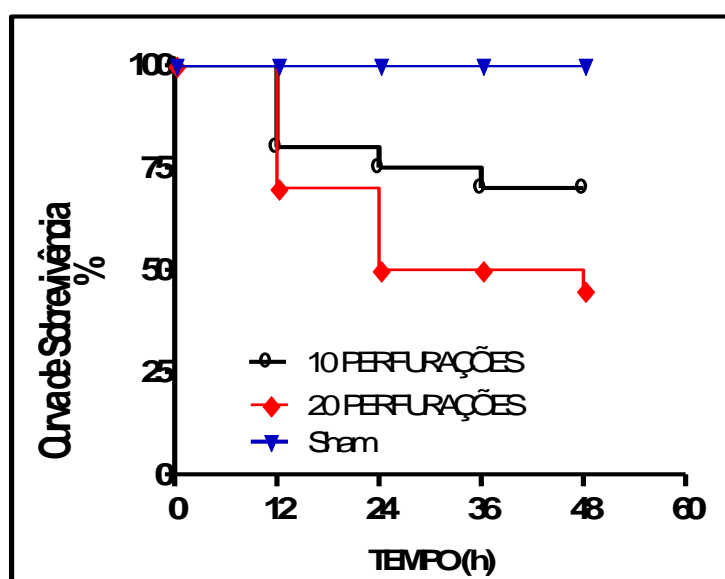


Figura 3. Curva de sobrevivência dos ratos submetidos à cirurgia de indução de sepse pelo modelo CLP, que receberam 10 ou 20 perfurações no ceco e de ratos falso-operados (*Sham*). Os valores estão expressos em porcentagem de sobrevivência nos tempos indicados até 48 h após a indução da sepse. O grupo CLP é estatisticamente diferente do grupo *Sham* (n= 20-40 animais).

Baseados nesses resultados, neste trabalho, a sepse induzida por 10 perfurações cecais foi o procedimento de escolha. Isto porque houve menor perda de ratos e uma menor severidade da patologia desenvolvida, o que permite acompanhar a evolução de possíveis alterações renais por um período de tempo mais longo (20 dias).

4.2.2 Grupos Experimentais

De acordo com a manobra experimental, o estudo foi composto por três grupos: Controle, *Sham* e CLP. Ratos de cada um desses três grupos ainda foram divididos em seis subgrupos para se avaliar o efeito da sepse em tempos diferentes, ao longo de 20 dias pós-sepse. Os subgrupos foram: 1ºdia, 2ºdia, 5ºdia, 10ºdia, 15ºdia e 20ºdia. Esses tempos foram previamente fixados por meio de experimento piloto. Durante todo o período, os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas, com temperatura ambiente controlada e em ciclo de luz claro/escuro de 14/10 h, com livre acesso à ração e água.

4.3 Protocolo Experimental

Após a cirurgia de indução da sepse e recuperação da anestesia, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas, individualmente, até o momento do sacrifício.

Durante todo o experimento as gaiolas metabólicas foram mantidas em uma sala com controle do ciclo claro-escuro (14/10 h) e da ventilação, além do monitoramento da temperatura ambiente. A sala possuía um ar condicionado que foi sempre ajustado para manter a temperatura seca em torno de 23-25°C.

A ingestão de água e a produção de urina diárias foram quantificadas diretamente nos frascos de água e urina que compunham as gaiolas, os quais tinham capacidade para 100ml.

Cada subgrupo experimental (representados por 1ºdia, 2ºdia, 5ºdia, 10ºdia, 15ºdia e 20ºdia) foi composto por animais controle, *Sham* e CLP (n= 6-12 animais). Vale ressaltar que em todos os subgrupos experimentais foram realizadas coletas de urina, sangue e, em seguida, os ratos foram sacrificados sob anestesia para a coleta de rim. Sendo assim, o animal definido como pertencendo ao subgrupo 1ºdia pós-sepse, passou pelas coletas e foi sacrificado neste dia.

A Figura 4 ilustra o delineamento experimental, mostrando os dias de avaliação do pós-sepse, sendo realizadas coletas de amostras e sacrifício dos animais dos grupos Controle, *Sham* e CLP.

No tempo zero os animais *Sham* e CLP foram submetidos à cirurgia, já anteriormente descrita.

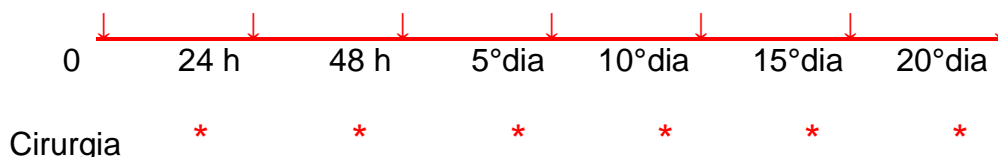


Figura 4. Cronograma de execução do protocolo experimental para avaliação do desenvolvimento de sepse em ratos. O * indica o momento de coleta e/ou medida de: fluxo urinário, ingestão de água, densidade urinária, amostras de sangue (pela cauda) e de urina de 24 h, pressão arterial, sacrifício dos ratos e remoção dos rins.

4.4 Coleta de Material

4.4.1 Coleta de Urina

Amostras de urina foram coletadas durante de 24 h, em todos os momentos previamente definidos. O volume foi medido em proveta graduada e a amostra foi centrifugada (3000 rpm, 5 min) para posterior processamento. Alíquotas de 1 a 2 ml foram congeladas a -20 °C até o momento dos ensaios.

4.4.2 Coleta de Sangue

Para a coleta de sangue, os ratos foram colocados, individualmente, em uma caixa de madeira aquecida (31 cm altura x 31 cm largura) por um período de cinco min. O objetivo do aquecimento foi causar vasodilatação na cauda facilitando, assim, a punção venosa da mesma e evitando o uso de anestésico. Logo após o período de aquecimento, o rato foi transferido para uma caixa de contenção compatível com o tamanho do mesmo, deixando exposta apenas a cauda. Após a assepsia da mesma, cerca de 700 µl de sangue foram coletados por punção da veia lateral esquerda utilizando um catéter BD de calibre 24. As amostras foram coletadas em eppendorff contendo 30 µl de heparina sódica, utilizada como anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min e o plasma foi armazenado em eppendorff a -20°C.

4.4.3 Coleta de Rim

Após anestesia, os rins dos ratos foram exsangüinados. Para isso, foi utilizada uma agulha (0,7 x 25 mm) acoplada a uma seringa de 10 ml preenchida com solução de NaCl 0,9% estéril. A seringa foi introduzida na artéria renal e a solução de NaCl 0,9% foi injetada lentamente. A manobra foi repetida 3 vezes para assegurar a completa lavagem dos rins. Em seguida, retirou-se um rim de cada vez, o qual foi acondicionado em um recipiente apropriado para posterior processamento:

- em *ependorff*, à temperatura de -20 °C para os ensaios bioquímicos;
- em *ependorff*, à temperatura de -80 °C para a análise por reação de polimerização em cadeia (PCR);
- em tubos *falcon* de 14 ml contendo formaldeído tamponado a 10% para as análises histológicas.

4.5 Procedimentos Analíticos

4.5.1 Mensuração e Registro da Pressão Arterial Sistólica

Um sistema de pletismografia de cauda digital (RTBP: Kent Scientific Co) foi utilizado para medir a pressão arterial sistólica (PAS) dos ratos. Nesse método, a artéria da cauda é brevemente ocluída com o auxílio de um pequeno 'cuff', além de um sensor que também é colocado na cauda do animal. Esse sensor é capaz de detectar a pulsação arterial e enviar o sinal analógico para um conversor analógico digital. O sinal digital é então processado por 'software' apropriado (CODAS).

4.5.2 Volume Globular (hematócrito)

Para a quantificação do hematócrito utilizou-se o método de microhematócrito onde se obteve a percentagem de hemácias pela centrifugação do sangue, dentro de um tubo capilar, a 10.000 rpm por 5 min.

4.5.3 Dosagem de Creatinina

A determinação da creatinina foi realizada pelo método de Jaffé modificado, utilizando-se o kit comercial da Bioclin (Brasil), composto por: i) solução padrão de creatinina (3mg/dl) (reagente nº 1), ii) solução de ácido pícrico (60 mmol/l) (reagente nº 2), iii) solução de NaOH (110 mmol/l), Na₂CO₃ (75 mmol/l) e surfactante (reagente nº 3) e iv) solução de CH₃COOH (12,25 mol/l) (reagente nº 4).

Este método consiste em uma reação colorimétrica entre a creatinina e o ácido pícrico, cujo produto é amarelo-avermelhado. A absorbância do composto formado foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV - 160 A, Japão), em comprimento de onda de 510nm, acertando o zero com o branco. Essa absorbância foi utilizada para a determinação da concentração de creatinina nas amostras de urina. Para as amostras de plasma, esse primeiro valor de absorbância é denominado de A1. Após a leitura de A1, às amostras de plasma e ao branco foram adicionados 0,050 ml do reagente nº 4. Após a homogeneização, uma segunda leitura de absorbância das amostras de plasma (A2) foi feita também a 510 nm, acertando o zero com o branco.

As amostras de urina foram previamente diluídas 1:25 e não passam pela etapa de acidificação, como o plasma. A concentração de creatinina, em mg/dl, foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Creatinina (mg/dl)} = (A1 - A2 / \text{absorbância padrão}) \times 3$$

Como a reação segue a lei de Lambert-Beer, o fator de calibração pode ser usado.

$$\text{Fator de calibração} = \text{concentração do padrão} / \text{absorbância do padrão}$$

$$\text{Creatinina (mg/dl)} = (A1 - A2) \times \text{fator de calibração}$$

$$\text{RFG (ml/min)} = ([\text{Creatinina}]_{\text{urina}} \times \text{Fluxo urinário}) / [\text{Creatinina}]_{\text{plasma}}$$

A fração de excreção de água (FE_{H_2O}) foi avaliada segundo a equação:

$$FE_{H_2O} (\%) = FU / RFG \times 100$$

4.5.4 Uréia Plasmática

Os níveis de uréia plasmática foram determinados por teste enzimático colorimétrico utilizando-se o kit Bioclin (Belo Horizonte, MG). O princípio básico da reação é a hidrólise da uréia em íons amônio (NH_4^+) e dióxido de carbono (CO_2), através da enzima urease. Em pH alcalino e na presença de salicilato e hipoclorito de sódio, a amônia origina um composto esverdeado, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de uréia na amostra analisada. A leitura da absorbância foi feita a 630 nm em espectrofotômetro. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e a concentração de uréia expressa em mg/dl.

$$\text{Fator de calibração} = \text{concentração do padrão} / \text{absorbância do padrão}$$

$$\text{Uréia plasmática (mg/dl)} = \text{absorbância da amostra} \times \text{fator de calibração}$$

4.5.5 Densidade Urinária

A densidade urinária específica (DEU) foi mensurada em refratômetro portátil RT 10 ATC, aplicando-se uma gota da amostra sobre o sensor. Caso o valor obtido da densidade ultrapassasse 1,050, a amostra era diluída 1:2 em água ultra pura sendo, o valor dos dois últimos dígitos, multiplicado por dois.

4.5.6 Proteinúria

A dosagem de proteína foi feita nas amostras de urina por colorimetria usando-se o kit Sensiprot (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil), disponível comercialmente. O teste se baseia na formação de um complexo pela reação entre o vermelho de pirogalol e o molibdato de sódio que, quando combinado com a proteína presente na amostra, em meio ácido, desenvolve um cromóforo de cor azul. A cor formada foi quantificada a 600 nm, sendo proporcional à concentração de proteína presente na amostra.

Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e a concentração de proteína urinária foi expressa em mg/dL.

Fator de calibração = concentração do padrão / absorvância do padrão

Proteínas urinárias (mg/dl) = absorvância da amostra x fator de calibração

4.5.7 Gama Glutamil Transferase Urinária

A dosagem da enzima gama glutamil transferase (γ GT) na urina γ GT foi feita nas amostras de urina pelo método cinético de Szasz modificado (1977) utilizando kit da Synermed e de acordo com as instruções do fornecedor. Este ensaio foi realizado na Escola de Medicina Veterinária/UFMG.

4.5.8 Dosagem de Sódio e Potássio

As concentrações de sódio (Na^+) e potássio (K^+) nas amostras de plasma e urina foram determinadas por fotometria de chama (CELM, FC180). O fotômetro de chama mede a intensidade da radiação emitida pelos átomos excitados dos metais-terrosos e a intensidade dessa emissão é proporcional a concentração desses metais nas amostras. Previamente à leitura das amostras, o fotômetro foi calibrado com as soluções padrões de sódio (140 mEq/l) e potássio (5mEq/l). As amostras de

plasma foram diluídas 1:200 para a leitura de sódio e potássio. Já as amostras de urina foram diluídas 1:200 para a leitura do sódio e 1:6000 para a leitura do potássio.

$$FE_{Na^+} (\%) = QE_{Na^+}/QF_{Na^+} \times 100 \quad // \quad FE_{K^+} (\%) = QE_{K^+}/QF_{K^+} \times 100$$

$$FR_{Na^+} (\%) = 100 - FE_{Na^+} \quad // \quad FR_{K^+} (\%) = 100 - FE_{K^+}$$

Sendo: FE, fração de excreção; FR, fração de reabsorção.

4.5.9 Osmolalidades Plasmática e Urinária

A medição das osmolalidades do plasma e urina foi feita utilizando o osmômetro de ponto de congelamento (Microsmette, Advanced Instruments). As amostras de plasma foram diluídas 1:2 e as amostras de urina foram diluídas 1:5. Previamente à leitura das amostras, o osmômetro foi calibrado com soluções padrões cujas concentrações eram 100 mOsm/kg, 290 mOsm/kg e 500 mOsm/kg.

$$C_{osm} (\text{ml/min}) = \text{Osmolalidade}_{urina} (\mu\text{Osm/ml}) / \text{Osmolalidade}_{plasmática} (\mu\text{Osm/ml}) \times \text{FU} (\text{ml/min})$$

$$C_{H_2O} (\text{ml/min}) = \text{FU} (\text{ml/min}) - C_{osm} (\text{ml/min})$$

Sendo: C, *clearance*; osm, osmolar; FU, fluxo urinário

4.6 Dosagem da Enzima Mieloperoxidase

Para medir o acúmulo de neutrófilos no rim, foi utilizado o método de quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO), como previamente descrito (De Matos et al., 1999).

Antes da realização do ensaio, retirou-se um fragmento de 100 mg das amostras armazenadas a -20 °C. Tal fragmento foi mantido num tubo plástico FALCON® de 14 ml mantido em banho de gelo durante todo o processamento. Adicionou-se, então, 1,9 ml de tampão 1 (NaCl 0,1M, Na₃PO₄ 0,02M, Na₂EDTA 0,015M – pH 7,4). O tecido foi homogenizado na presença do tampão 1 e o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, adicionou-se 1,5 ml de solução gelada de NaCl 0,2% ao precipitado remanescente. Após 30 segundos, adicionou-se 1,5 ml de solução gelada de NaCl 1,6% e glicose 5%. O precipitado foi homogeneizado rapidamente e centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi novamente desprezado sendo, então, adicionados 1,9 ml de tampão 2 (Na₃PO₄ 0,05M, HETAB 0,5% p/v – pH 5,4) ao precipitado remanescente. Uma nova homogeneização foi

realizada e o homogenato foi armazenado a -20 °C em 'eppendorf' de 2 ml até a realização do ensaio.

Para o ensaio propriamente dito, as amostras foram, inicialmente, descongeladas à temperatura ambiente e, em seguida, novamente congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas a seguir, em água corrente. Os congelamentos e descongelamentos foram repetidos por 3 vezes. Após esses ciclos, as amostras descongeladas foram centrifugadas a 10000 rpm durante 15 min. O sobrenadante dessa centrifugação foi utilizado no ensaio.

Os sobrenadantes das amostras (25 µl) foram adicionados, em duplicata, a uma placa de ELISA de 96 poços. O branco (tampão 2, 25 µl), também em duplicata foi acrescentado à placa. O ensaio prosseguiu pela adição de 25 µl de tetramethylbenzine (3,845 mg/ml em dimetilsulfóxido) e incubando a placa a 37 °C em estufa, por 5 min. Após este período, 100 µl de H₂O₂ foram adicionados (0,002% em tampão 2) e a placa foi novamente incubada a 37 °C, 5 min. Para finalizar, 100 µl de H₂SO₄ (1 M) foram adicionados aos poços e a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm.

Para o cálculo da atividade da mieloperoxidase a média das absorbâncias das duplicatas foi multiplicada por 0,93 e, a esse produto, foi somado 0,0031. Esse resultado foi multiplicado pelo fator de diluição. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10⁵.

4.7 Conteúdo renal de RNA mensageiro para TNF α , TGF β 1 e IL-10

O conteúdo renal de RNA mensageiro que codifica receptores de TGF β 1 e TNF α e IL-10 foi determinado utilizando a reação polimerase (PCR) em tempo real.

A partir da busca na base de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foi possível selecionar a seqüência dos RNA mensageiros das proteínas sob estudo em questão em ratos. De posse da seqüência completa, foram identificadas as seqüências codificantes, que foram então utilizadas para a seleção dos *primers* para cada uma das proteínas estudadas, relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Seqüência de DNA dos pares de *primers* utilizados para amplificação do cDNA das proteínas avaliadas neste estudo.

<i>Proteínas</i>	<i>Primers</i>
Receptor TGFβ1	Sense 5'-TTGCCCTCTACAACCAACACAA-3'
	Anti-sense 5'-GGCTTGCGACCCACGTAGTA-3'
Receptor TNFα	Sense 5'-CGTGTTCGTGGTGTGTTGGT-3'
	Anti-sense 5'-GCGCCGACCGCTAT GAG-3'
GAPDH	Sense 5'- ATGTTCCAGTATGACTCCACTTCACG-3'
	Anti-sense 5'-GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA-3'

A expressão renal do RNA mensageiro foi determinada utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

Para a preparação das amostras para a RT-PCR foram realizadas as seguintes etapas:

4.7.1 Extração do RNA Mensageiro

Para a extração do RNA mensageiro, foi utilizado um fragmento de 100 mg contendo porções da córtex e medula renal. O fragmento foi armazenado em um tubo estéril, a – 80 °C até o momento da extração.

As amostras foram descongeladas e, a elas, adicionado 1 ml de RNazol para cada 100 mg de tecido. Em seguida, foram trituradas com a ajuda de um homogeneizador e permaneceram em repouso por 15 min, no gelo. Em seguida, foram adicionados 200 µl de clorofórmio para cada ml da suspensão obtida que foi, então, homogeneizada em agitador de tubos, por 15 seg. Estes tubos foram incubados durante 2-3 min no gelo e centrifugados a 10.000 rpm, por 15 min. A fase aquosa obtida foi transferida para um novo tubo no qual foram adicionados 500 µl de isopropanol para cada ml de suspensão, procedendo-se nova homogeneização. Nova incubação no gelo foi feita por 10 min e o homogeneizado foi centrifugado (10.000 rpm, por 10 min, a 4 °C). O sobrenadante foi removido e, ao precipitado contido no tubo, foi acrescentado 1 ml de etanol 75% gelado para cada ml de suspensão. Outra homogeneização foi feita em agitador de tubos, seguida por centrifugação (5.000 rpm, por 5 min, a 4 °C). Após esta centrifugação, o sobrenadante (fase etanólica) foi descartado, mantendo-se o tubo aberto para a secagem do precipitado à

temperatura ambiente. Por fim, o precipitado foi ressuspenso em 30 µl de água DEPEC.

A determinação da concentração de RNA mensageiro foi realizada em alíquotas obtidas a partir da diluição das amostras em água deionizada (1:200). A absorbância foi lida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Os tubos contendo as amostras foram mantidos a -80 °C até o momento do uso e a concentração de RNA foi obtida de acordo com a equação abaixo:

$$[\text{RNA}] = \frac{\text{Absorbância a 260 nm} \times 40 \text{ (1 O.D.RNA = 40 } \mu\text{g/mL)} \times 200 \text{ (diluição)}}{1000}$$

4.7.2 Transcrição Reversa

Imediatamente antes do início da transcrição reversa, uma alíquota do RNA mensageiro extraído foi diluída em água milliQ, de forma a obter uma solução de RNA com concentração de 0,2 µg/µL. Para a transcrição, foram pipetados, em um tubo de centrífuga (tipo “eppendorf”), 1,8 µl de dNTP 10 mM, 2,5 µl de RT buffer 5X, 1,0 µl de DTT 100 mM, 0,2 µl de RNAsin 10.000 U, 1,0 µl de oligo dT (1:10) 50 ng/ml e 5 µl (1,0 µg) de RNA a 0,2 µg/µl. O tubo contendo essa mistura foi colocado no termociclador previamente programado com o seguinte protocolo: 70 °C por 5 min, 4 °C por 5 min, e 25 °C. Nesse ponto, ao atingir 25 °C, a ciclagem deve ser interrompida, pelo acionamento do botão “pause”, para permitir a adição de 1 µl da enzima transcriptase reversa 200 U diluída 1:4. O botão “pause” foi acionado novamente para reiniciar a ciclagem: 25 °C por 5 min, 37 °C por 60 min, 70 °C por 5 min, 4 °C por 5 min. Ao cDNA obtido (12,5 µl), foram adicionados 17,5 µl de água milliQ estéril. A alíquota de 30 µl obtida foi armazenada a -20 °C.

4.7.3 PCR em Tempo Real

A PCR em tempo real foi realizada em placa de 96 poços apropriada para o procedimento. Para evitar pipetagens sucessivas diretamente nos poços, foi previamente feita uma mistura dos constituintes comuns a todas as reações em tubo *eppendorf* estéril. O volume final dessa mistura foi variável dependendo do número de reações a ser executado. Para cada poço da placa, foi transferida uma alíquota de 20 µl da mistura que consistiu de 2,5 µl de tampão Sybr 10x, 2,0 µl de uma mistura dNTPs (200 µM cada), 3 µl de MgCl₂, 2 µl do “primer sense”, diluído 1:80 em água milliQ (100 nM), 2 µl de “primer antisense”, diluído 1:80 em água milliQ

(100 nM), 0,125 µl de polimerase (Amplitaq Gold) (0,25U/µl) e 8,725 µl de água milliQ. O cDNA (5 µl), preparado conforme descrito no item anterior, foi adicionado a cada poço da placa. O volume final em cada poço (reação) foi de 25µl. Os poços foram cobertos com tampas apropriadas e a placa submetida à centrifugação a 1500 rpm, por 1 min, para a homogenização das reações. Em seguida, a placa foi transferida para o equipamento de PCR em tempo real (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System – Applied Biosystems).

4.8 Dosagem de Citocinas

As concentrações de interleucina seis (IL-6) e do TNF α na urina, no plasma e no rim foram determinadas usando Kit ELISA Duo Set (R&D Systems, Minneapolis, MN), que emprega a técnica tipo sanduíche, ou seja, padrões, amostras e conjugados são pipetados na placa e, se houver IL-6, e TNF α , estes são apresentados como sanduíche pelos anticorpos imobilizados e pelo anticorpo monoclonal específico para a citocina. Após a lavagem para remoção de outras substâncias não ligadas ao anticorpo e/ou reagentes, um substrato ácido foi adicionado à solução que desenvolveu coloração na proporção da quantidade de IL-6 e TNF α ligados. A intensidade da cor foi medida por leitura de densidade óptica em leitor automático de Elisa, em comprimento de onda de 450 nm. As concentrações de IL-6 e TNF α na urina, plasma e no rim, foram calculadas a partir dos resultados obtidos na curva padrão, realizada com IL-6 e TNF α recombinante para ratos, dosados no ensaio.

Após o descongelamento das amostras, microplacas de 96 orifícios foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais para IL-6 e TNF α . Nestas placas foram adicionados 50 µl de urina e de macerado do tecido renal (diluição 1:2), 50 µl dos controles positivos e negativos e 50 µl da IL-6 e TNF α nas concentrações de 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,2 pg/ml para obtenção da curva padrão. A seguir, 100 µl de conjugado policlonal anti – IL-6 e anti – TNF α marcado com peroxidase foram adicionados às placas com posterior incubação, por 3 h, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram realizadas 4 lavagens com solução detergente. Em seguida, foi adicionado aos orifícios das placas, o substrato formado por peróxido de hidrogênio (0,02%) e tetrametilbenzina (2%). A reação foi interrompida, 30 min após o seu início, utilizando ácido sulfúrico 1M. A intensidade

da cor foi medida por leitura de densidade óptica em leitor automático de Elisa, em comprimento de onda de 450 nm. As concentrações de IL-6 e TNF α na urina e no rim foram calculadas a partir dos resultados obtidos na curva padrão construída com IL-6 e TNF α recombinante para ratos dosados no ensaio.

Para que não houvesse interferência da concentração urinária nos valores de IL-6 e TNF α , foi feita a razão entre as concentrações de IL-6 e de TNF α urinários e da concentração de creatinina urinária (IL-6 ur/Cr_u e TNF α ur/Cr_u), dosada na mesma amostra.

4.9 Análise Histológica

Cortes longitudinais do rim esquerdo foram coletados de animais controle, *Sham* e CLP, conforme descrito no item 4.4.3. Os rins foram armazenados em paraformaldeído tamponado, até o processamento histológico. As lâminas montadas contendo 3 fatias de 4 μ m de tecido renal foram coradas em hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e tricrômico de Masson.

As lâminas foram, qualitativamente, examinadas utilizando-se microscopia convencional (Axoplan 2.0, Zeiss).

4.10 Análise Morfométrica

As secções de rim de 4 μ m, retiradas sempre longitudinalmente com presença de área medular e cortical, foram coradas pelas técnicas de hematoxilina e eosina, para avaliação morfométrica.

Posteriormente foram adquiridas imagens digitais do tecido com auxílio do microscópio óptico modelo *Olympus BX 41* (objetiva de 40x, 60x e 100x), acoplado a uma câmara digital *Olympus Q Color*. Imagens adquiridas de 10 campos para glomérulos e 30 para túbulos, por lâmina, foram submetidas às análises morfométricas utilizando-se o programa *Image J*.

Através desse equipamento, estabeleceram-se os seguintes parâmetros histológicos a serem analisados: diâmetro da cápsula de Bowman (Fig. 5A), diâmetro do tufo glomerular (Fig. 5B), diâmetro do espaço de Bowman (calculado pela subtração do diâmetro da cápsula de Bowman do diâmetro do tufo glomerular) e diâmetro dos túbulos proximais.

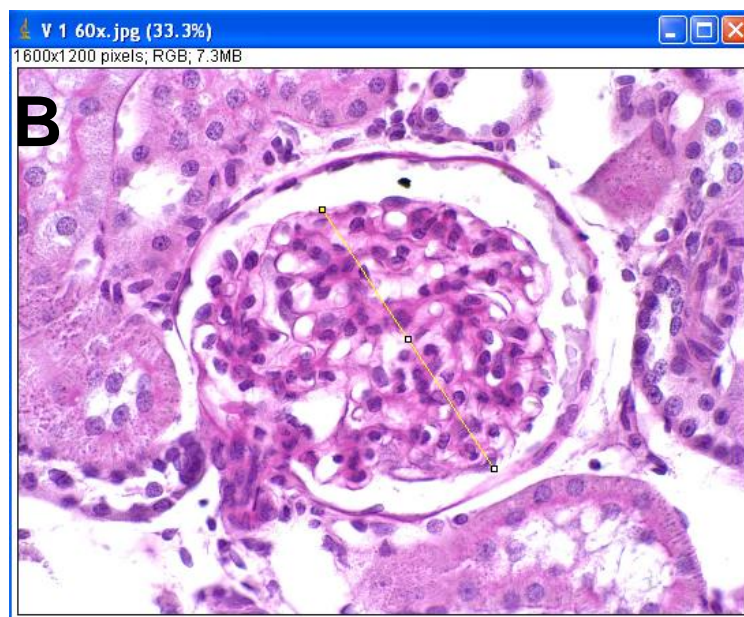
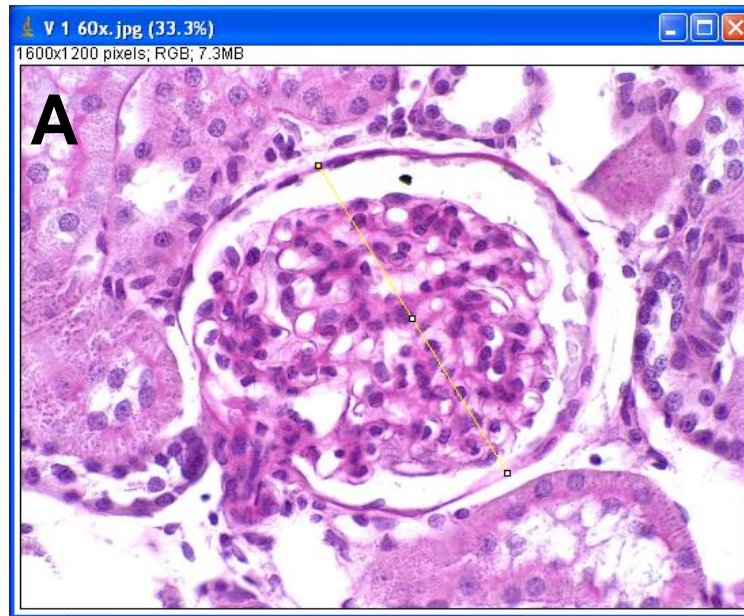


Figura 5. Medida do diâmetro da cápsula de Bowman (A) e do diâmetro do tufo glomerular (B). Coloração: HE; aumento de 60x. A linha delgada amarela indica a extensão da medida na imagem da tela do computador usando o programa *Image J*, correntemente usado em morfometria.

4.11 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão da média ($X \pm$ EPM).

Os dados obtidos nos grupos Controle, *Sham* e CLP em cada momento avaliado (subgrupo experimental) foram analisados por ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls e Two-way-ANOVA seguida de teste Bonferroni. O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

A comparação ao longo do tempo nos animais CLP, em parâmetros que apresentaram diferença entre estes e os demais animais, foi realizada utilizando-se One-Way-ANOVA com pós teste Newman-keuls, para considerados significativos $p \leq 0,05$. O programa de estatística usado foi o GraphPad Prism 4.0.

5 RESULTADOS

Os resultados apresentados, a seguir, são dados experimentais referentes à investigação do efeito da sepse, em ratos, utilizando o modelo onde a sepse foi induzida por perfurações no ceco seguidas de extravasamento do conteúdo cecal (modelo de sepse CLP, *cecal ligation perforation*, 10 perfurações), sobre o rim. O trabalho focalizou, basicamente, sobre a investigação de parâmetros da função renal e avaliação do aspecto morfológico renal e do desenvolvimento do processo inflamatório renal

5.1 Efeito da Sepse sobre o Peso Corporal e a Ingestão de Água

A Figura 6 mostra o peso corporal dos ratos dos grupos Controle, *Sham* e CLP ao longo dos vinte dias de avaliação experimental. Os ratos Controle e *Sham* tiveram aumento do peso de, aproximadamente, 80 gramas ao final do período avaliado (20 dias). Já os ratos do grupo CLP apresentaram uma perda significativa de peso, em torno de 50 gramas, não havendo diferença entre os momentos da avaliação. Cabe ressaltar que a quantidade de ração ingerida pelos ratos dos três grupos foi semelhante.

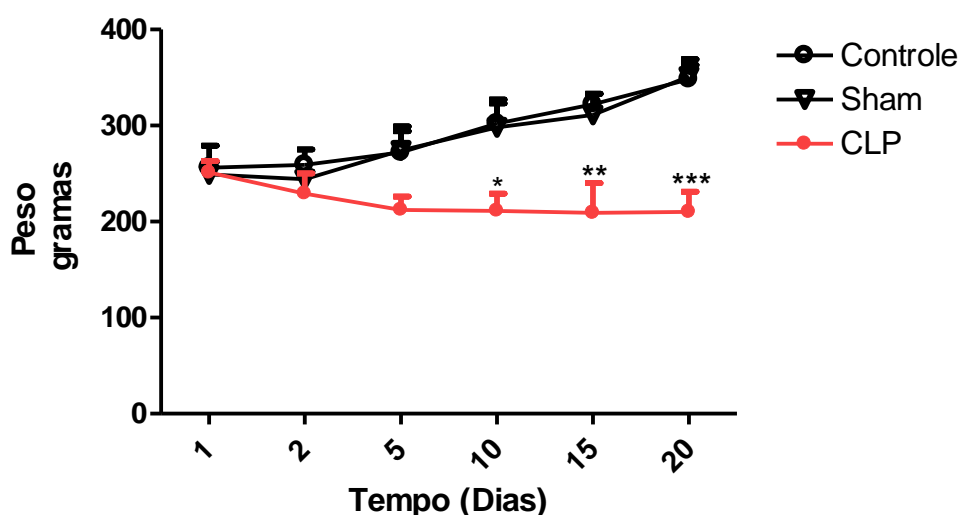


Figura 6. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre o peso corporal ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 8 - 12/\text{tempo}$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs Controle e vs *Sham*.

Já a ingestão de água pelos ratos do grupo CLP foi significativamente maior do que nos ratos Controle e *Sham* durante todo o período avaliado (20 dias) (Fig. 7).

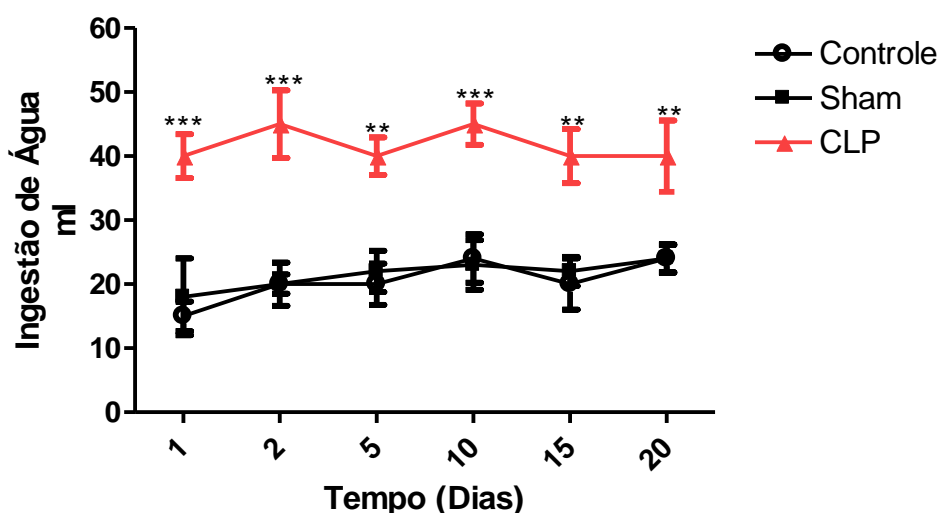


Figura 7. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a ingestão de água ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 8 - 12/\text{tempo}$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle e vs sham.

Além disso, também foram observados, nos ratos CLP, sinais clínicos como piloereção, tremores, sangramento ocular, prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação, principalmente no primeiro dia pós-sepse. A piloereção e a perda de massa muscular foram observadas ao longo dos vinte dias de avaliação. Já nos ratos dos grupos Controle e *Sham* não foi detectada nenhuma alteração clínica ou comportamental.

5.2 Efeito da sepse sobre a Pressão Arterial Sistólica

A Figura 8 compara a pressão arterial sistólica (PAS) nos três grupos experimentais avaliados nesse estudo (Controle, *Sham* e CLP). A PAS apresentou-se bastante reduzida no grupo CLP, redução esta observada apenas no 1º dia pós-indução da sepse (CLP, $62,0 \pm 9,4$ mmHg; *Sham*, $122,0 \pm 10,7$ mmHg; Controle, $130,0 \pm 7,1$ mmHg). Nos dias 5 e 15 pós-sepse, a PAS no grupo CLP encontrava-se elevada, com valor similar aos valores de PAS medidos nos grupos Controle e *Sham* (Fig. 8).

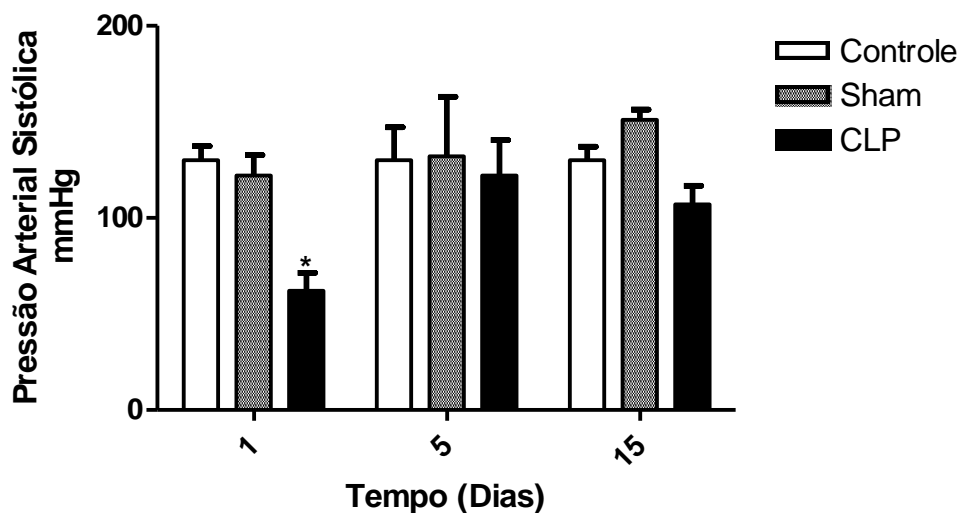


Figura 8. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a pressão arterial sistólica em 3 tempos ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 4/\text{tempo}$). * $p < 0,05$, vs Controle e vs Sham.

5.3 Efeito da Sepse sobre o Volume Globular (Hematócrito)

A Figura 9 mostra que os ratos do grupo CLP apresentaram aumento do volume globular observado somente no 1º dia pós-indução da sepse (CLP, $54,0 \pm 0,7\%$; Sham, $44,0 \pm 0,3\%$; Controle $44,0 \pm 0,5\%$). A partir do 2º dia pós-sepse, o hematócrito encontrava-se reduzido, com valor similar aos valores de hematócrito observados nos grupos Controle e Sham (Fig. 9).

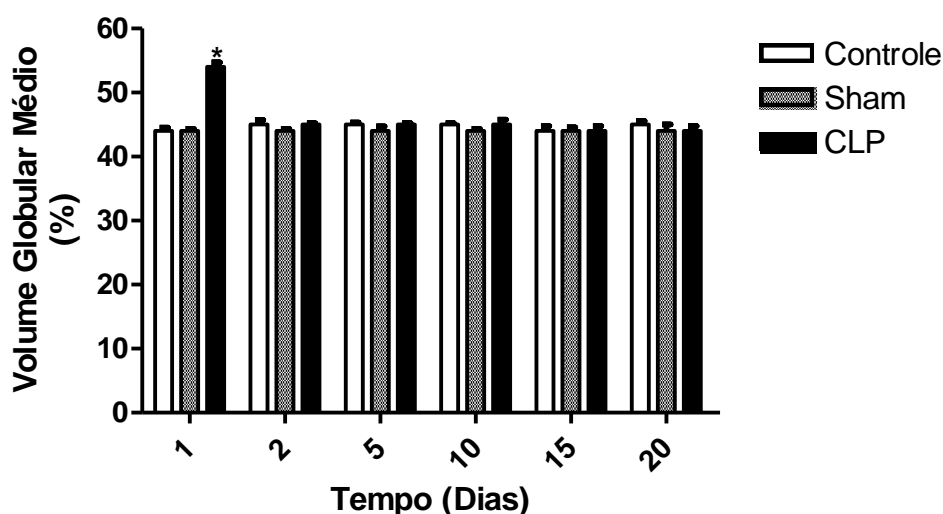


Figura 9. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre o volume globular (hematócrito) medido ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 3/\text{tempo}$). * $p < 0,05$ vs Controle e vs Sham.

5.4 Efeito da sepse sobre a Função Renal

5.4.1 Creatinina Plasmática e Ritmo de Filtração Glomerular

Conforme ilustrado na Figura 10 (painel superior), a sepse promoveu um grande aumento da concentração plasmática de creatinina. Concomitantemente, houve queda do RFG (Fig. 10, painel inferior), estimado pelo *clearance* da creatinina. Estes efeitos já eram máximos no 1º dia pós-sepse e assim permaneceram até o final do período observado (20 dias).

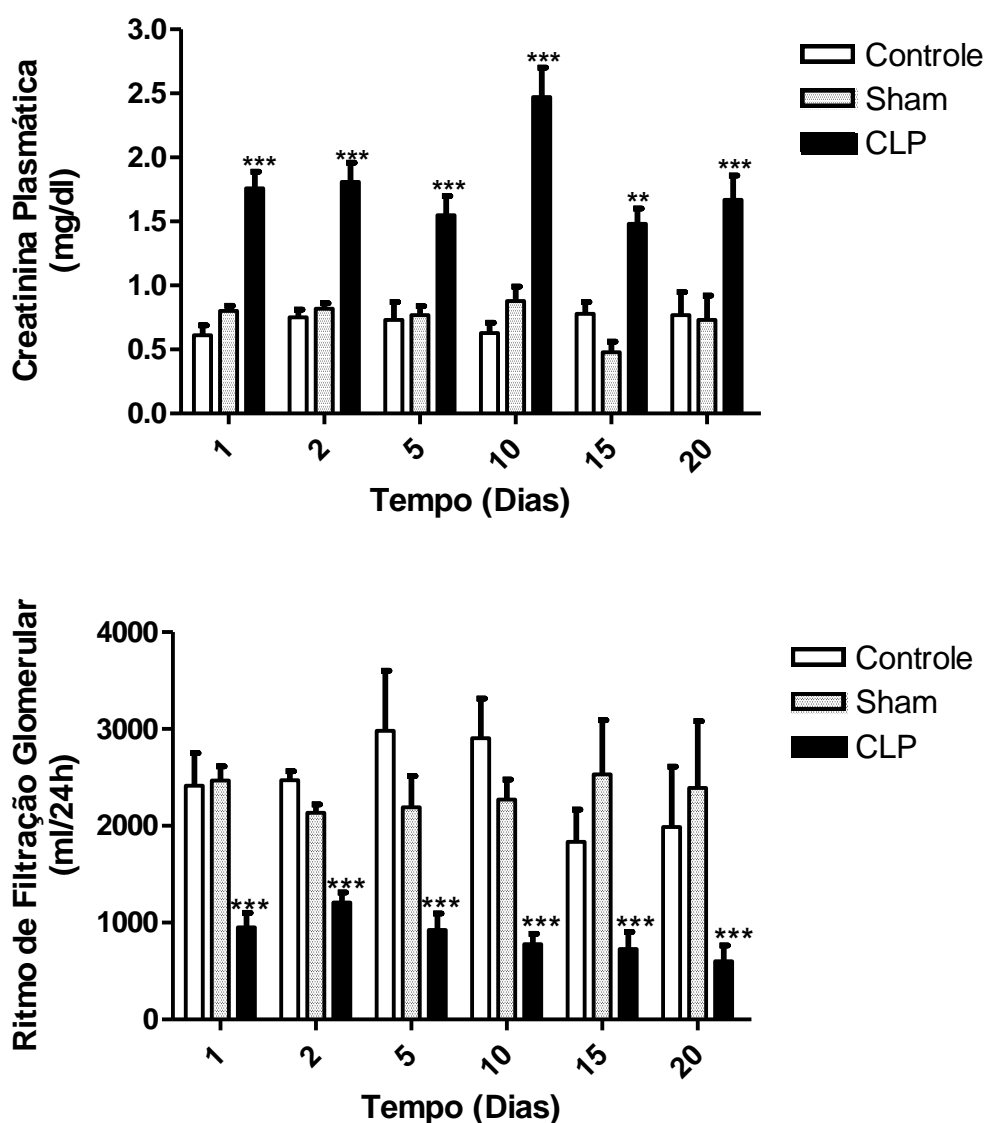


Figura 10. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a creatinina plasmática (**painel superior**) e o ritmo de filtração glomerular, estimado pelo *clearance* de creatinina (**painel inferior**), ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 6 - 12/tempo). ** p < 0,01 e *** p < 0,001 vs Controle e vs Sham.

5.4.2 Uréia Plasmática

De forma semelhante à creatinina, os níveis elevados de uréia plasmática (Fig. 11) também indicam que os ratos do grupo CLP apresentaram um considerável comprometimento da função renal quando comparados aos ratos dos grupos Controle e *Sham*, em todos os tempos analisados. Este efeito também já era máximo no 1º dia pós-sepse e assim permaneceu até o final do período observado (20 dias).

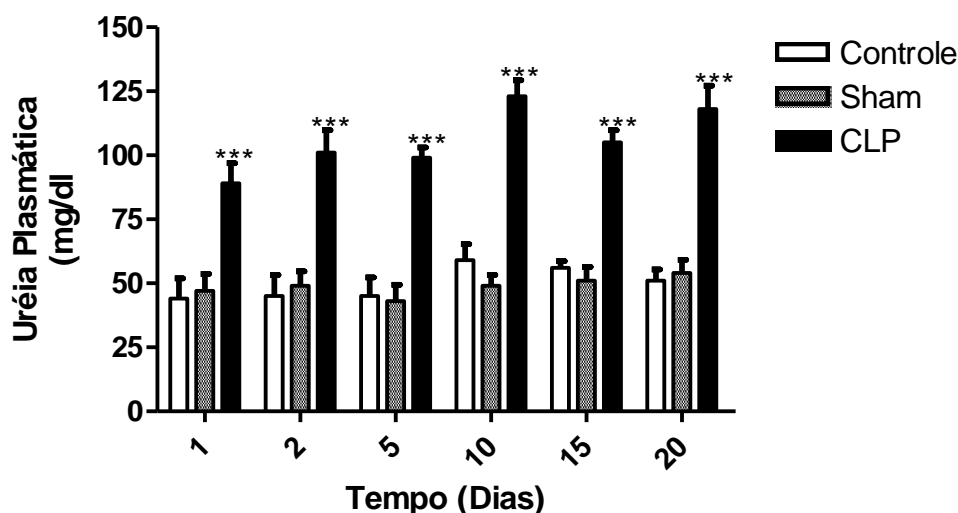


Figura 11. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a concentração plasmática de uréia ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 3 - 4$ /tempo). *** $p < 0,001$ vs Controle e *Sham*.

5.4.3 Fluxo Urinário e Fração de Excreção de Água

A Figura 12 mostra que a sepse também produz um aumento acentuado do fluxo urinário na maioria dos tempos avaliados ao longo de 20 dias. Este aumento, associado à queda do RFG (Fig. 10, painel inferior), refletiu em aumento da fração de excreção de H_2O (Fig. 13).

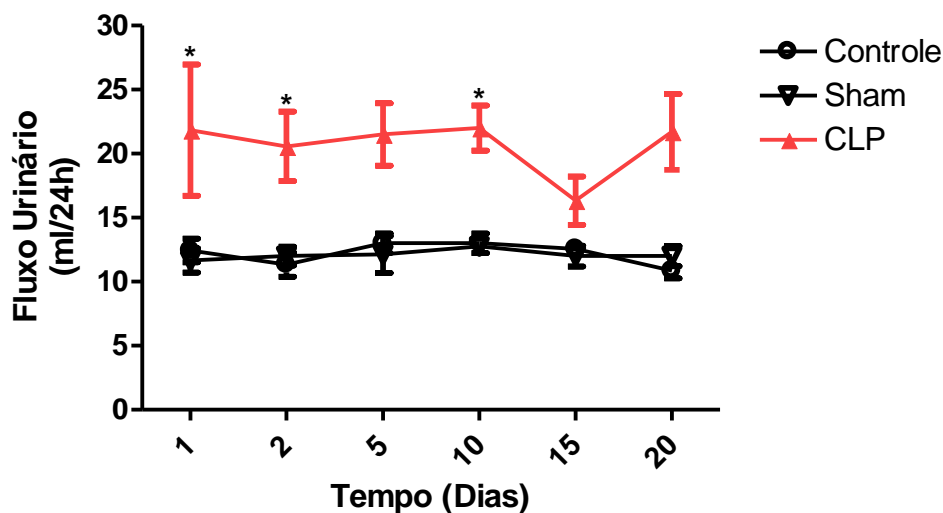


Figura 12. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre o fluxo urinário ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 4 - 12/tempo). *p<0,05 vs Controle e vs Sham.

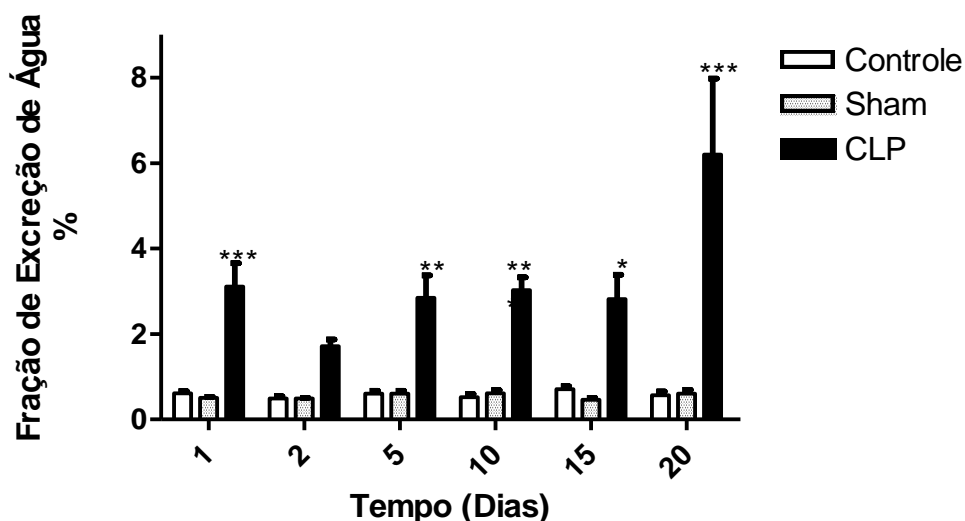


Figura 13. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a fração de excreção de H₂O ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 6 - 12/tempo). *p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 vs Controle e vs Sham.

5.4.4 Densidade Urinária, Proteinúria e Enzima Gama Glutamil Transferase Urinária

A Figura 14 mostra que a sepse promoveu uma diminuição drástica da densidade específica urinária (DEU), observada em todos os dias avaliados ao longo dos vinte dias pós-sepse. Tal diminuição se deve ao processo séptico e não ao

procedimento cirúrgico, visto que não há diferença significativa entre os grupos Controle e *Sham*, em nenhum dos momentos avaliados.

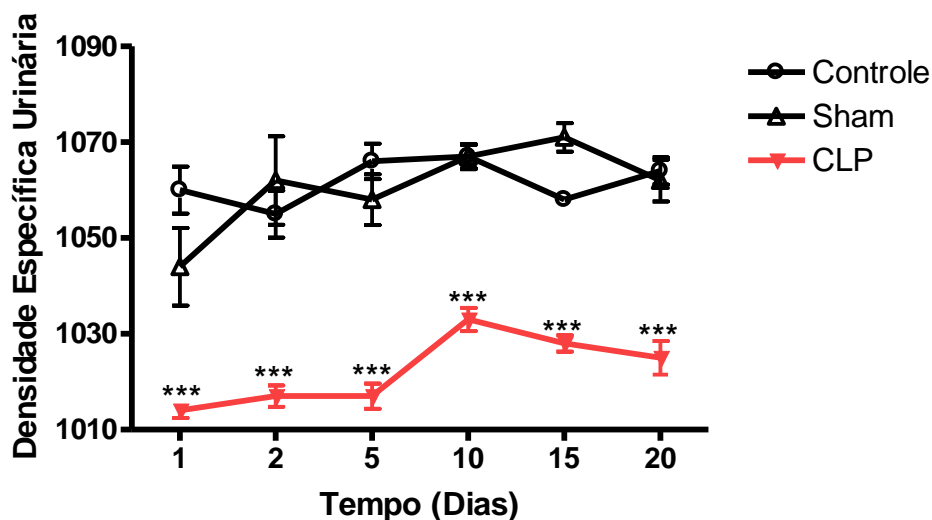


Figura 14. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a densidade específica urinária ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 3 - 8$ /tempo). *** $p < 0,001$, vs Controle e vs *Sham*.

Em consonância com os resultados mostrados anteriormente, os ratos submetidos à sepse apresentaram proteinúria intensa. Este efeito, já observado no 1º dia pós-sepse, permaneceu elevado ao longo dos 20 dias de observação (Fig. 15).

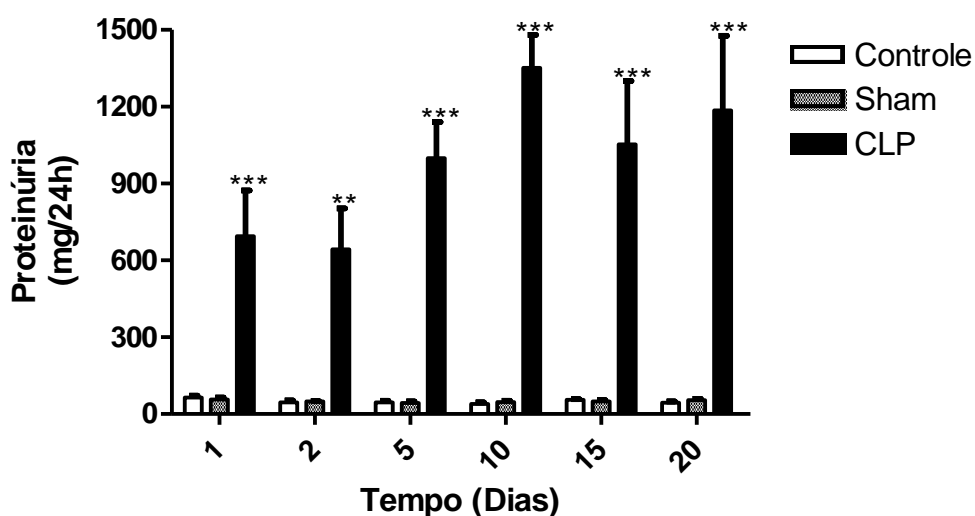


Figura 15. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a excreção urinária de proteína ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 3 - 8$ /tempo). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs Controle e vs *Sham*.

Pela Figura 16 pode-se observar que houve correlação entre a proteinúria (aumentada) e a excreção urinária de creatinina (diminuída) (relação UP:C). Os ratos do grupo CLP apresentaram um aumento desta relação durante todos os dias avaliados, o que caracteriza um agravamento da lesão renal nesse grupo (CLP).

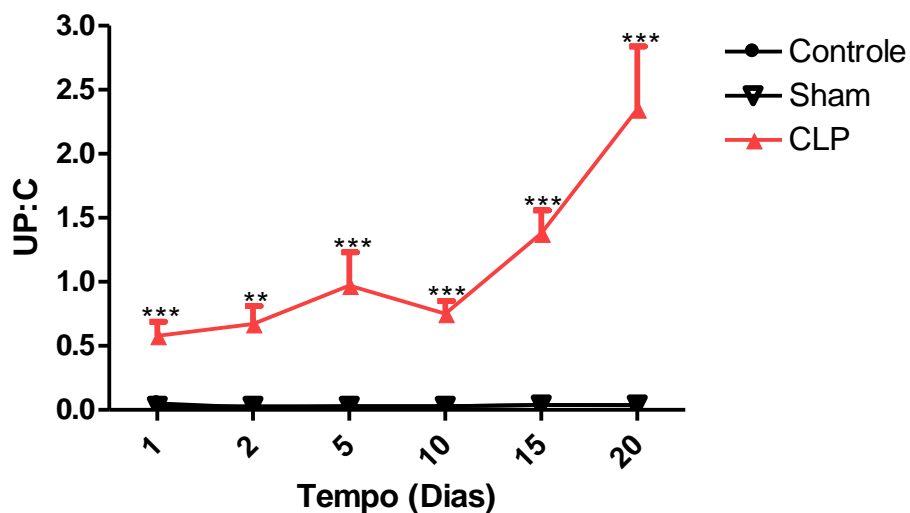


Figura 16. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a relação proteína/creatinina urinárias (UP:C) ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 3 - 8$ /tempo). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle e vs *Sham*.

A Figura 17 mostra os níveis da enzima γ GT na urina dos ratos dos 3 grupos estudados. No 1º dia pós-sepse a γ GT urinária apresenta-se significativamente aumentada nos ratos submetidos à CLP, assim como no 2º, 10º e 20º dias. No 5º dia, a excreção urinária dessa enzima reduz para, aproximadamente, metade daquela observada no 1º dia, nos grupos Controle e *Sham*.

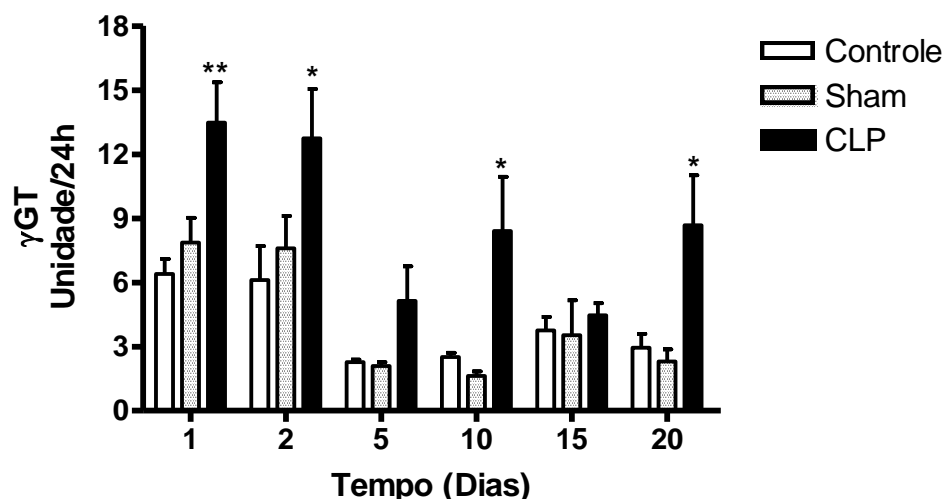


Figura 17. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a excreção urinária da enzima gama glutamil transferase (γ GT) ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 6$ /tempo). * $p < 0,05$ vs Controle e vs *Sham*.

5.4.5 Sódio, Potássio e Água Livre

A Tabela 2 sumariza os valores médios das concentrações plasmáticas e urinárias de sódio, potássio e das osmolalidades plasmáticas e urinárias nos três grupos experimentais (Controle, *Sham* e CLP) conforme determinações feitas nos dias 1, 10 e 20 pós-indução de sepse. Apenas as concentrações de sódio, potássio e osmolalidade urinárias foram afetadas pela indução da sepse, as quais apresentaram-se reduzidas, quando comparadas aos grupos Controle e *Sham*, apenas no 1º dia pós-sepse. Nos 10 e 20 da avaliação, nenhuma diferença significativa foi observada entre os três os grupos sob estudo.

As frações de excreção de sódio (Fig. 18) e de potássio (Fig. 19) não foram afetadas pela sepse no 1º dia pós-indução da mesma. No entanto, a partir do 5º dia, tanto a fração de excreção de sódio (Fig. 18), quanto à fração excreção de potássio (Fig. 19) foram significativamente aumentadas nos ratos do grupo CLP.

Tabela 2. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre as concentrações plasmáticas e urinárias de sódio e potássio e das osmolalidades plasmáticas e urinárias avaliadas nos dias 1, 10 e 20 dias após a indução.

Parâmetro	Controle			Sham			CLP		
	1º Dia	10º Dia	20º Dia	1º Dia	10º Dia	20º Dia	1º Dia	10º Dia	20º Dia
[Na ⁺] pl mEq/l	141±3	139±3	139±3	137±1	147±5	141±2	138±2	140±3	139±2
[Na ⁺] ur mEq/l	111±7	97±7	126±20	123±23	86±8	119±19	14±24 ^{***}	69±8	100±9
[K ⁺] pl mEq/l	4,5±0,3	4,8±0,2	4,4±0,2	4,6±0,2	4,7±0,2	4,3±0,2	4,3±0,1	4,8±0,5	4,0±0,1
[K ⁺] ur mEq/l	315±53	580±60	382±742	310±29	580±61	367±10	179±24 ^{**}	383±63	322±47
Osm pl mOsm/l	285±3	283±4	283±6	288±6	283±5	282±2	250±15	275±5	286±2
Osm ur mOsm/l	3545±101	4118±184	3396±106	3477±284	4359±330	3207±86	1442±152 [*]	2655±44	2471±382

[], concentração; Osm, osmolalidade; pl, plasma; ur, urina; Os valores representam a média ± erro padrão da média. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05

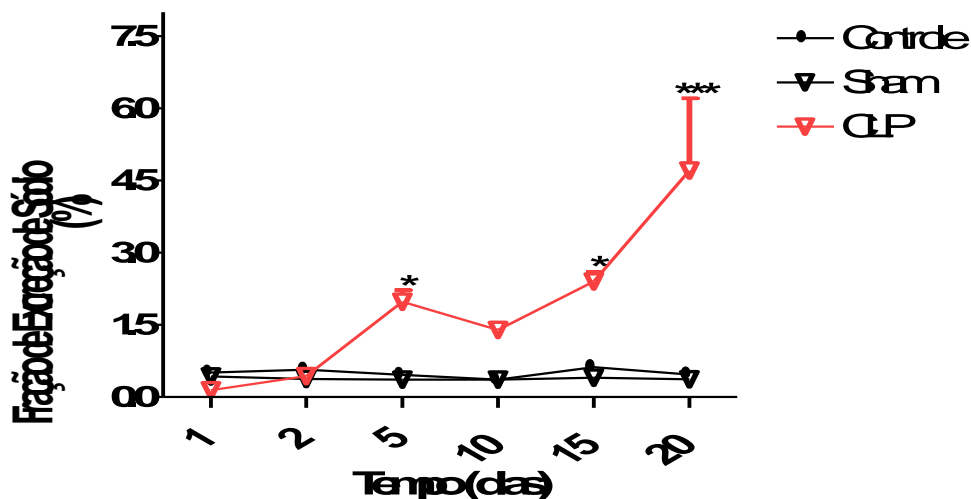


Figura 18. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a fração de excreção de sódio ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média ± erro padrão da média (n = 3 - 8/tempo). *p<0,05 vs Controle e vs Sham.. *p<0,05 e ***p<0,001 vs Controle e vs Sham.

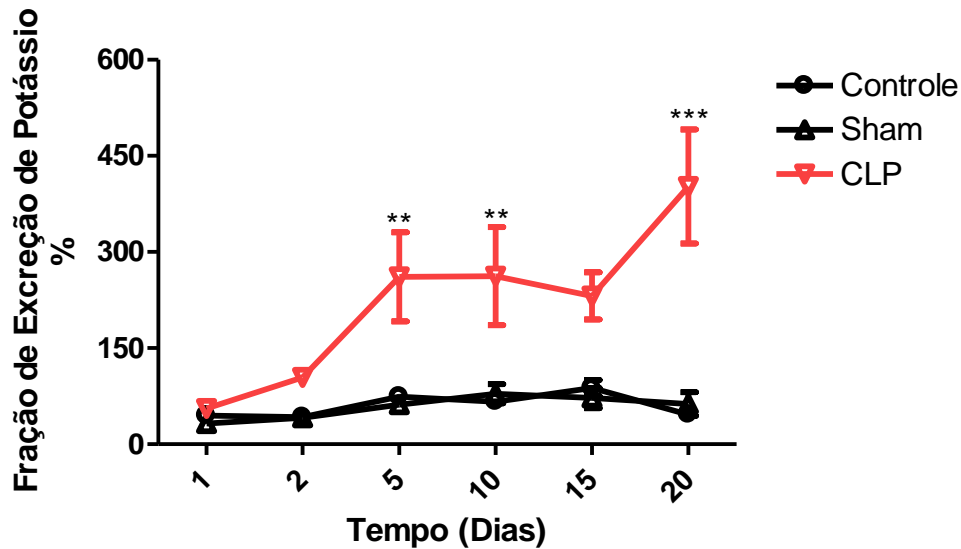


Figura 19. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a fração de excreção de potássio ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 3 - 8/tempo). **p<0,01 e ***p<0,001 vs Controle e vs Sham.

Conforme mostrado na Figura 20, a sepse não afetou, significativamente, o *clearance* osmolar (Figura 20A) nem o *clearance* de H₂O livre (Figura 20B).

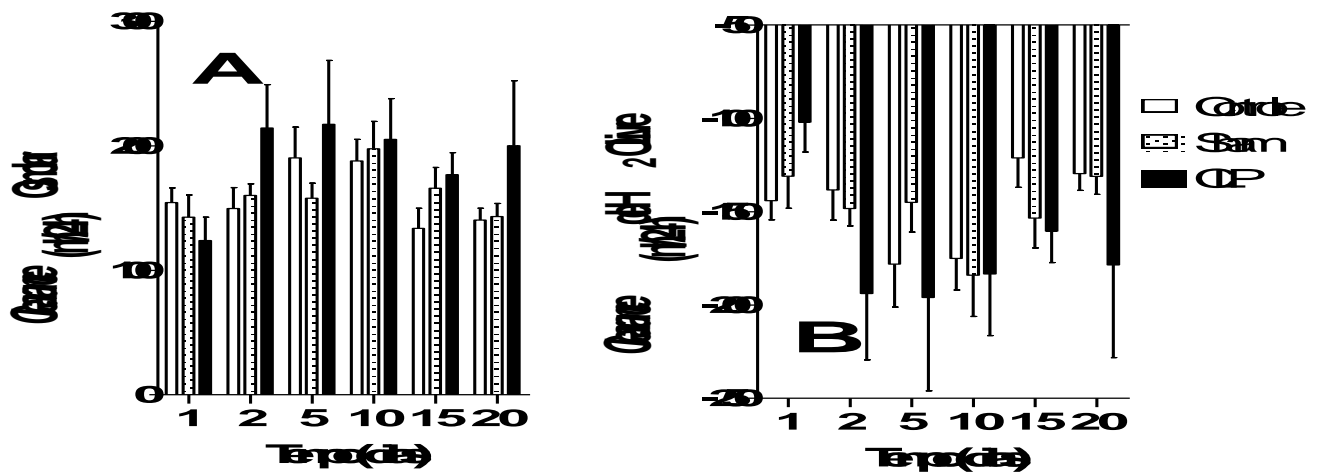


Figura 20. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre o *clearance* osmolar (A) e *clearance* de H₂O livre (B) ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 6 - 12/tempo).

5.5 Efeito da Sepsis sobre o Aspecto Morfológico Renal

5.5.1. Análise Histológica

Para se estimar a quantidade de glomérulos com alteração parcial ou completa, foi necessário definir a esclerose glomerular de acordo com: existência de alteração segmentar ou total de um glomérulo causada por deposição mesangial de material hialino, aumento da matriz dessa estrutura, colapso de capilares glomerulares e adesão do tufo à cápsula de Bowman (Grond *et al.*, 1986; Laferty e Brenner, 1990).

Cortes histológicos típicos de rins de ratos dos grupos Controle, *Sham* e CLP, após preparo (como descrito no item 4.4.3) e coloração pelo Tricrômico de Masson estão mostrados na Figura 21. Alterações significativas não foram observadas nos ratos dos grupos Controle (Fig. 21A) e *Sham* (Fig. 21B). Já nos ratos do grupo CLP foram observadas alterações principalmente na estrutura glomerular. A Figura 21 (C a F) mostra a evolução das alterações morfológicas durante a instalação da doença renal observada nos dias 1 (C), 5 (D), 10 (E) e 15 (F) após a indução da sepsis. As setas nos painéis da Figura indicam as lesões observadas. Pode-se observar a ocorrência de proliferação difusa das células mesangiais com expansão da matriz, o que confere um aspecto lobulado aos tufos glomerulares. Nas micrografias D a E (Fig. 21) ainda pode-se observar que alças capilares têm a parede espessada com desdobramento da membrana basal glomerular e interposição da matriz mesangial no espaço subendotelial, o que são alterações compatíveis com o quadro de glomerulonefrite. A Figura 21F (20 dias pós-sepsis) apresenta esclerose glomerular parcial com começo de adesão ao tufo glomerular.

A Figura 21G apresenta corte histológico de rim no 10º dia onde pode-se observar a presença de núcleo picnótico e vacuolização, o que sugere processo de necrose tubular.

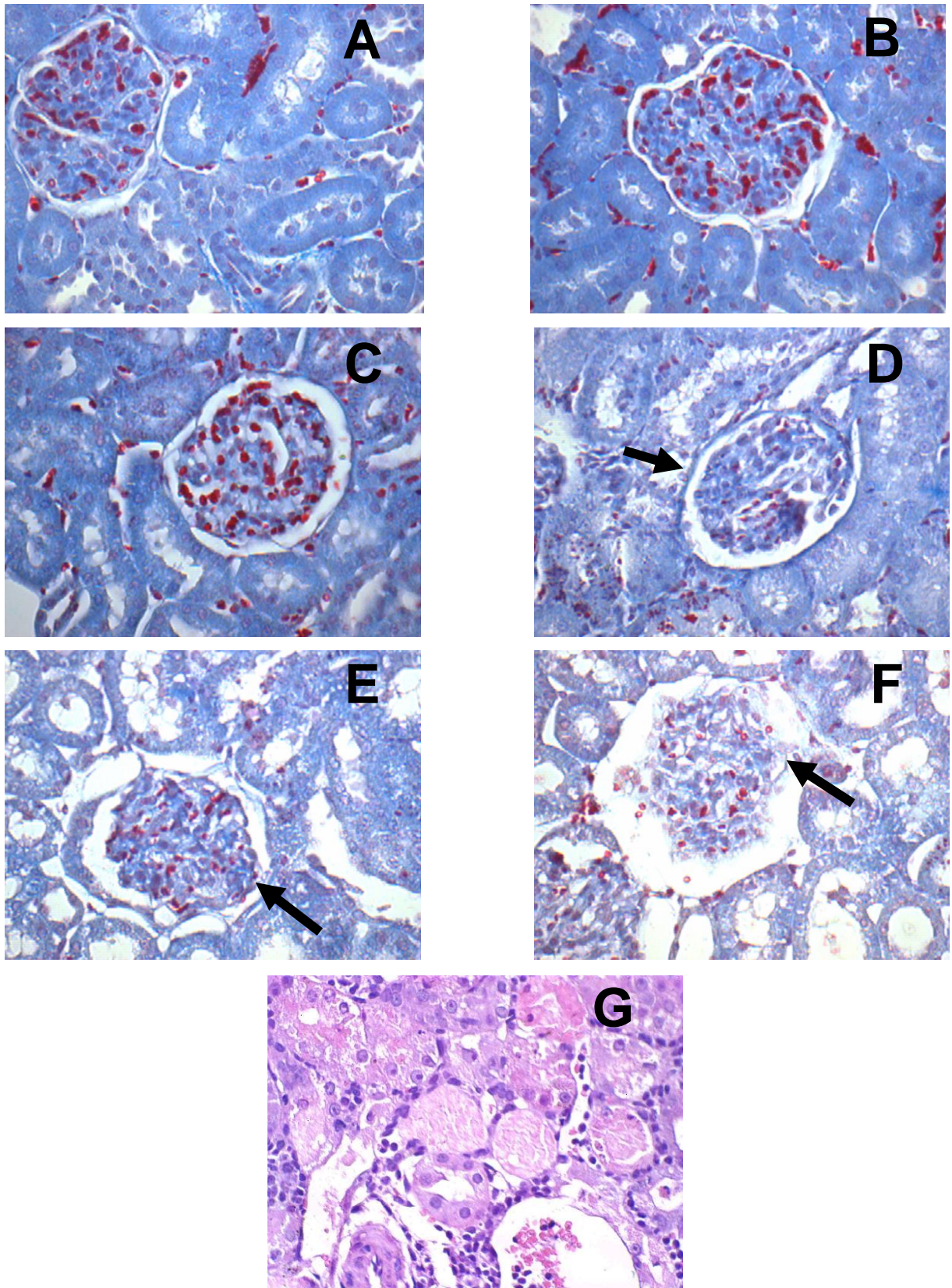


Figura 21. Cortes histológicos de rins de ratos dos grupos Controle, *Sham* e CLP corados por Tricômico de Masson (aumento: 40x) e HE (**G**, aumento de 60x). **A**, corte de rim de rato do grupo Controle; **B**, corte de rim de rato do grupo *Sham*. Os painéis **C**, **D**, **E** e **F** representam rins de ratos do grupo CLP nos dias 1, 5, 10 e 20, respectivamente. **G** representa um corte histológico de rim de rato CLP no 10^o dia pós-sepse.

5.5.2 Análise Morfométrica

A morfometria glomerular de ratos do grupo CLP apresentou diferença significativa dos demais grupos quanto ao diâmetro da cápsula de Bowman (Fig. 22A) e diâmetro do tufo glomerular (Fig. 22B).

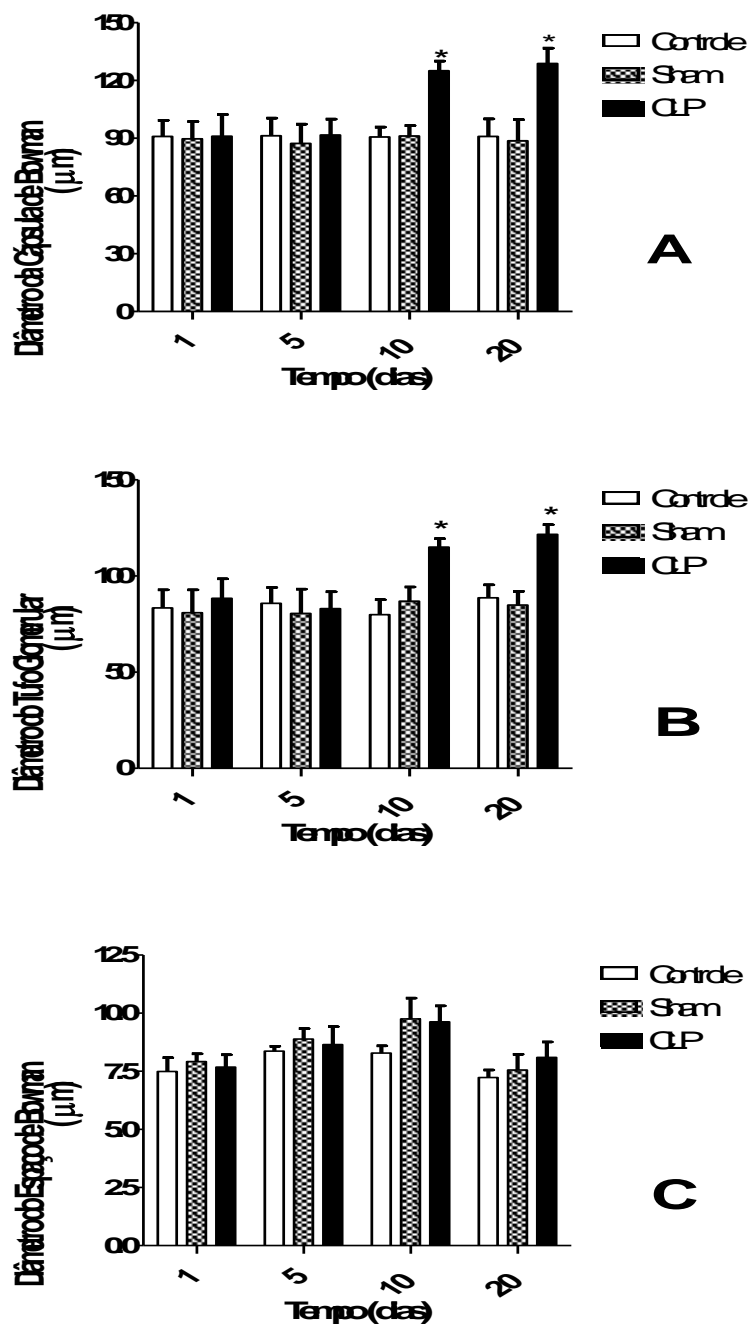


Figura 22. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP sobre o diâmetro da cápsula de Bowman (A), diâmetro do tufo glomerular (B) e diâmetro do espaço de Bowman (C) ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média ± erro padrão da média (n = 3/tempo). *p < 0,05 vs Controle e vs Sham.

Já com relação ao diâmetro do espaço de Bowman (Fig. 22C) não houve diferença significativa.

A análise morfológica renal revelou alterações glomerulares como maior diâmetro da cápsula de Bowman e do tufo glomerular, compatíveis com nefrosclerose presente em diferentes momentos de instalação nos ratos do grupo CLP.

Com relação à análise morfométrica tubular (Fig. 23) não foi constatada diferença significativa entre os grupos. Este fato pode ter sido decorrente da presença de túbulos proximais atrofiados e outros hipertrofiados, o que pode tornar a média de seus diâmetros equivalente às dos grupos Controle e *Sham*.

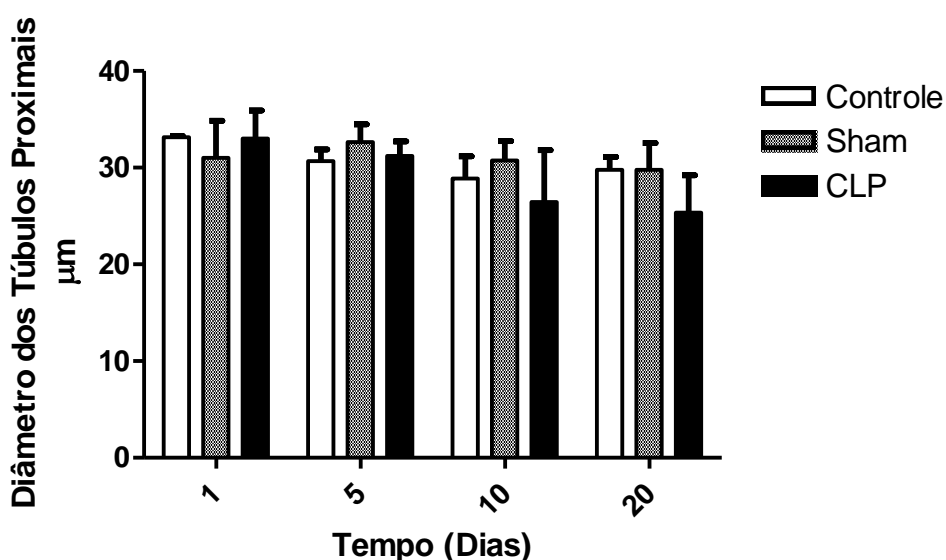


Figura 23. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre o diâmetro dos túbulos proximais ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 3$ /tempo).

A Tabela 3 sumariza os valores médios para os diâmetros medidos nas diferentes estruturas.

Tabela 3. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre os diâmetros da cápsula de Bowman, do tufo glomerular, do espaço de Bowman e dos túbulos proximais medidos nos dias 1, 10 e 20 dias após a indução.

Diâmetro (µm)	Controle			Sham			CLP		
	1° Dia	10° Dia	20° Dia	1° Dia	10° Dia	20° Dia	1° Dia	10° Dia	20° Dia
Cápsula de Bowman	91,0 ± 8,3	91,0 ± 5,1	91,0 ± 9,2	89,0 ± 8,9	91,0 ± 10,0	88,0 ± 11,0	91,0 ± 11,3	125,0 ± 5,1*	128,0 ± 8,0*
Tufo Glomerular	83,0 ± 9,3	79,0 ± 7,8	88,0 ± 9,2	80,0 ± 11,9	86,0 ± 9,8	84,0 ± 11,7	88,0 ± 10,0	112,0 ± 9,4	119,0 ± 11,9
Espaço da Cápsula de Bowman	7,5 ± 0,6	7,3 ± 0,3	7,2 ± 0,3	7,9 ± 0,3	9,8 ± 0,9	7,6 ± 0,7	7,7 ± 0,5	11,0 ± 0,7***	10,0 ± 0,7***
Túbulos Proximais	33,0 ± 0,1	28,0 ± 2,3	29,0 ± 1,3	31,0 ± 3,8	30,0 ± 2,0	29,0 ± 2,8	33,0 ± 2,9*	30,0 ± 5,3	25,0 ± 3,9

Os valores representam a média ± erro padrão da média. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05 vs Controle e vs Sham.

5.6 Investigação do Processo Inflamatório Renal após Indução de Sepse por CLP

5.6.1 Atividade da Mieloperoxidase Renal

O acúmulo de neutrófilos foi avaliado pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) que é um indicador indireto do número de neutrófilos. Como mostrado na Figura 24, a atividade desta enzima foi acentuadamente aumentada nos ratos do grupo CLP em comparação aos ratos dos grupos Controle e Sham. Interessantemente, os níveis de MPO renal no grupo CLP, 24 h após a indução de sepse, diminuíram progressivamente até que seus valores se tornassem semelhantes àqueles observados nos grupos Controle e Sham.

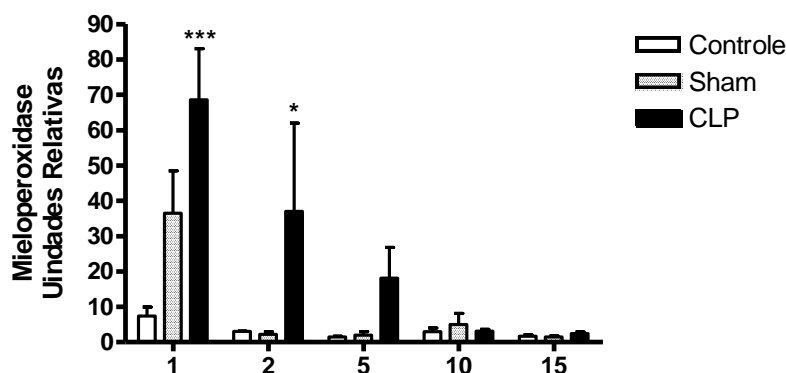


Figura 24. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) renal 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 4/\text{tempo}$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs Controle e vs *Sham*.

5.6.2 Envolvimento de Citocinas Pró-Inflamatórias

A Figura 25 mostra que a sepse não afetou, significativamente, o conteúdo renal de RNA mensageiro que codifica $\text{TNF}\alpha$, em nenhum dos dias avaliados. Por exemplo, no 5º dia pós-sepse, o conteúdo de RNA mensageiro (em unidades arbitrárias) foi $1,24 \pm 0,41$, $1,28 \pm 0,57$ e $1,25 \pm 0,46$ nos grupos Controle, *Sham* e CLP, respectivamente.

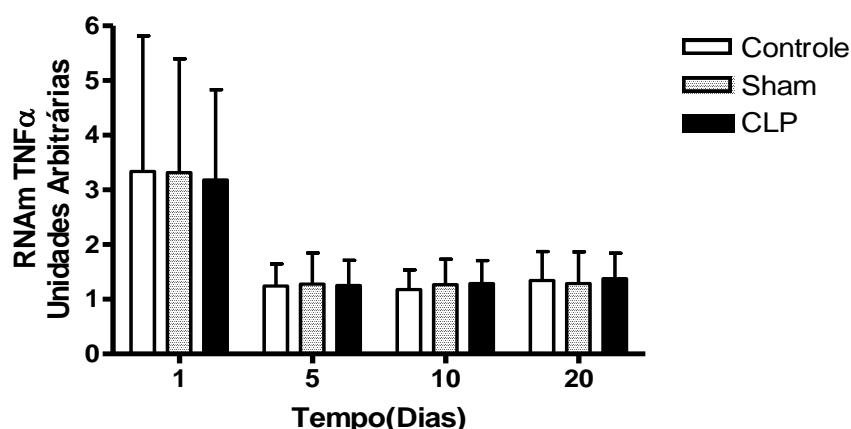


Figura 25. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre o conteúdo de RNA mensageiro que codifica $\text{TNF}\alpha$ no tecido renal ao longo de 20 dias após indução. O conteúdo de RNA mensageiro foi determinado utilizando-se a PCR em tempo real. Os níveis de expressão da proteína, relacionados aos níveis de expressão do GAPDH, foram expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 4/\text{tempo}$) de unidades arbitrárias de fluorescência obtidas durante a fase de ampliação exponencial (Ct) do cDNA.

Para confirmar ou descartar um possível envolvimento do $\text{TNF}\alpha$ e da IL-6 nas lesões renais produzidas pela sepse, os níveis dos mesmos foram determinados no plasma, rim e urina. Cabe ressaltar que nem o TNF nem a IL-6 foram detectados no plasma em nenhum dos dias pós-sepse analisados. No entanto, conforme pode ser observado na Figura 26A, o $\text{TNF}\alpha$ renal encontrava-se aumentado apenas no 1º dia pós-sepse enquanto que, neste mesmo dia, o $\text{TNF}\alpha$ quase não pôde ser detectado na urina (Fig. 26B). Nos demais dias analisados, o $\text{TNF}\alpha$ renal estava bastante diminuído. Em contraste ao TNF renal e embora não tenha alcançado significância estatística devido à grande variabilidade experimental, houve tendência de aumento do $\text{TNF}\alpha$ urinário ao longo dos 20 dias analisados.

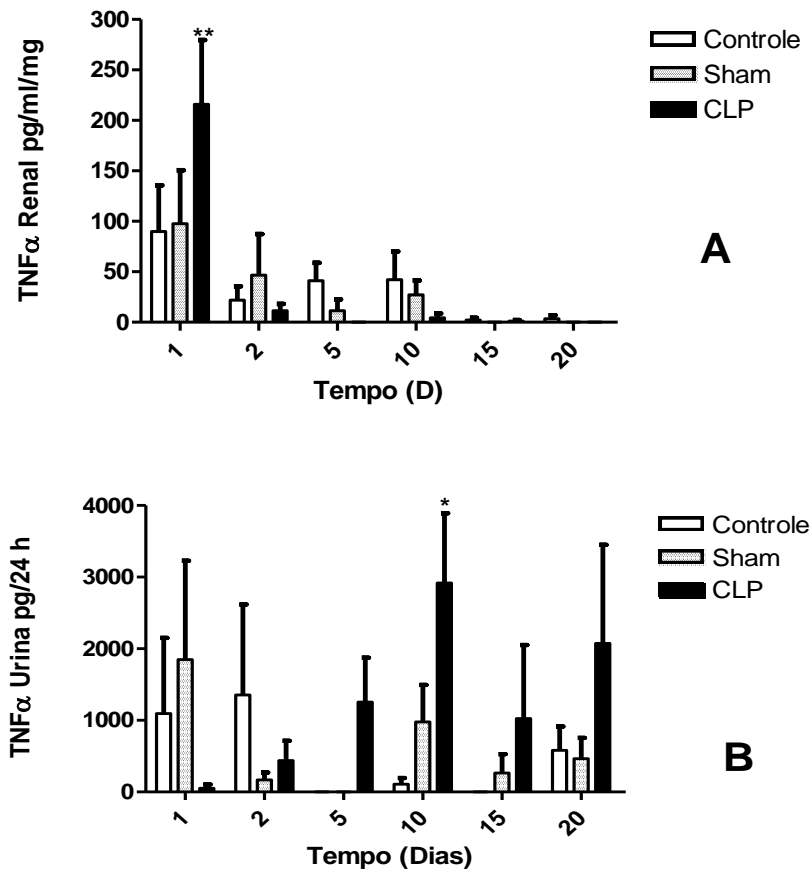


Figura 26. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre os níveis de TNF α no rim (**A**) e na urina (**B**) ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 4 - 8/tempo). *p<0,05, **p<0,01 vs Controle e vs Sham.

A Figura 27 ilustra os níveis de IL-6 renal e urinário ao longo de 20 dias após a indução de sepse pelo modelo CLP. Similarmente ao observado para o TNF α renal, a IL-6 renal já se encontrava elevada no 1º dia pós-sepse (Figura 27A). No entanto, esta citocina também se encontrava aumentada nos rins do grupo Sham, indicando que o procedimento cirúrgico, por si, já aumentava os níveis renais da IL-6 (Fig. 27A). Nos demais dias analisados, os níveis de IL-6 renal estavam diminuídos de forma similar nos 3 grupos estudados. Já a IL-6 urinária estava bastante diminuída nos dois primeiros dias pós-sepse, nos 3 grupos analisados. No entanto, no 5º e 10º dias, embora sem alcançar significância estatística, os níveis urinários de IL-6 encontravam-se elevados quando em comparação com os demais dias analisados (Fig. 27B).

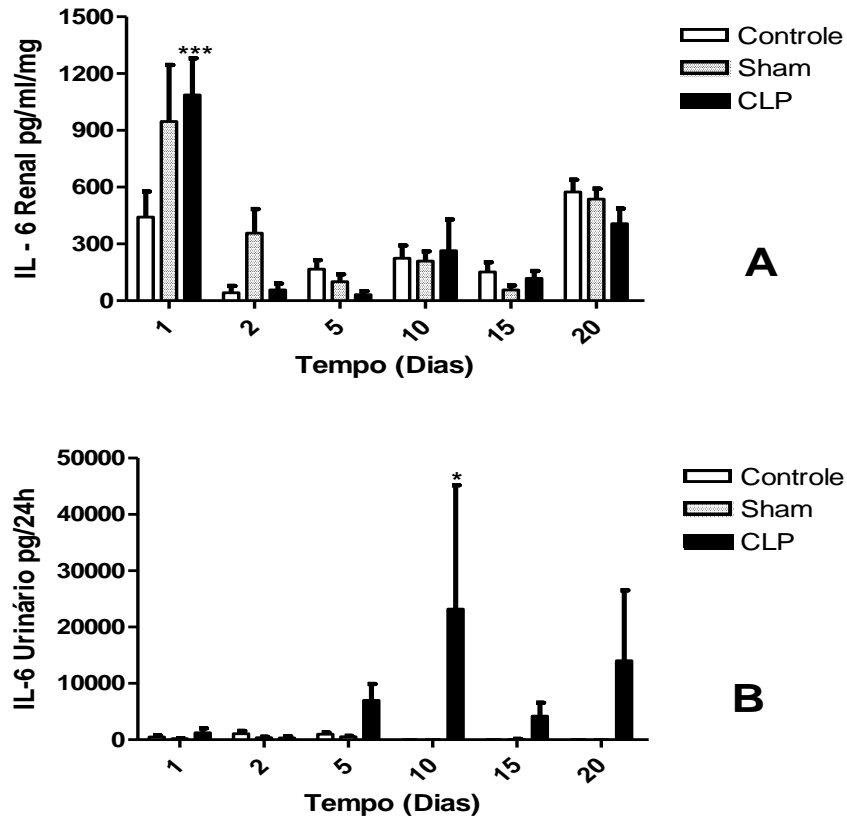


Figura 27. Efeito da sepse induzida pelo modelo CLP sobre os níveis de IL-6 no rim (A) e na urina (B) ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 4 - 8/tempo). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs Controle vs Sham.

A Figura 28 mostra as razões TNFa urinário / Creatinina urinária (Figura 28A) e IL-6 urinária / Creatinina urinária (Figura 28B) ao longo de 20 dias pós-sepse. No 20º dia de observação, houve um aumento acentuado de ambas as razões nos ratos com sepse.

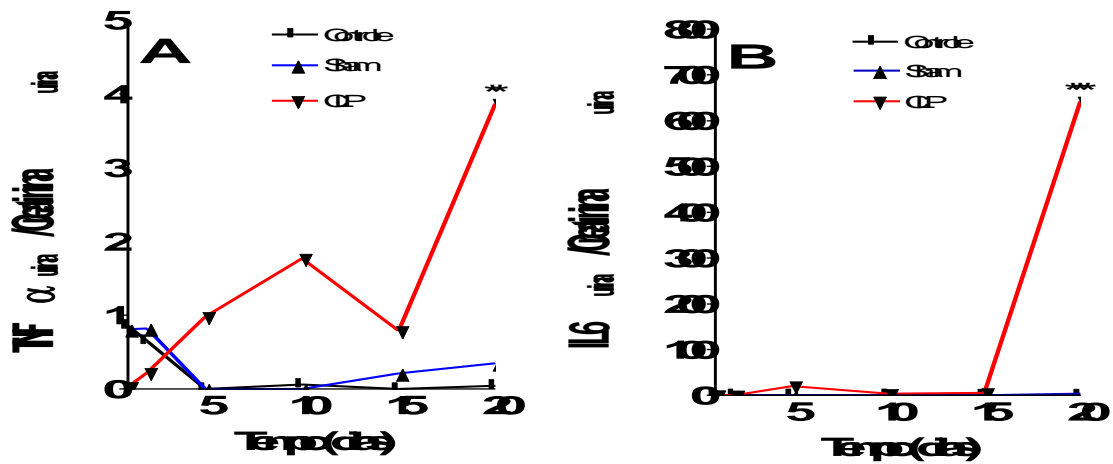


Figura 28. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre as razões TNF urinário / Creatinina urinária (A) e IL-6 urinária / Creatinina urinária (B) ao longo de 20 dias após a indução. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 4 - 8/tempo). **p<0,01 e ***p<0,001 vs Controle e vs Sham.

5.6.3 Envolvimento de Citocinas Pró-Fibróticas

A Figura 29 ilustra o efeito da sepse sobre o conteúdo renal de RNA mensageiro que codifica TGF β nos diferentes dias avaliados. Apenas no 20^o dia após indução, o RNAm renal para o TGF β foi significativamente aumentado pela sepse (em unidades arbitrárias: CLP, 2,84 \pm 0,03; Sham 0,95 \pm 0,04; Controle, 0,96 \pm 0,03).

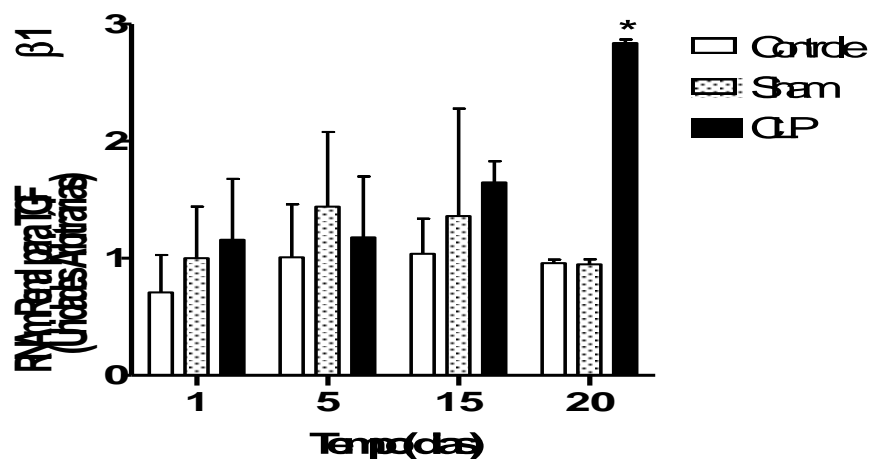


Figura 29. Efeito da sepse (10 perfurações cecais) induzida pelo modelo CLP em ratos sobre o conteúdo de RNA mensageiro que codifica TGF β 1 no tecido renal ao longo de 20 dias após indução. O conteúdo de RNA mensageiro foi determinado utilizando-se a PCR em tempo real. Os níveis de expressão da proteína, relacionados aos níveis de expressão do GAPDH, foram expressos como média \pm erro padrão da média (n = 3 - 5/tempo) de unidades arbitrárias de fluorescência obtidas durante a fase de ampliação exponencial (Ct) do cDNA. *p<0,01 vs Controle e vs Sham.

6 DISCUSSÃO

A sepse é uma patologia grave, com alta incidência (cerca de 18 milhões por ano no mundo inteiro) (Niederman *et al.*, 1990; Rangel-Frausto, 2005) e com mortalidade em torno de 30% dos pacientes (Antonelli *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2004). Diante destes números, a sepse se tornou alvo de estudo de muitos grupos de pesquisa. A partir daí, começaram a ser conhecidas as alterações por ela causadas tais como hipotensão e hipoperfusão e alterações imunológicas, que dão origem a sintomas que podem levar o paciente à morte em poucas horas. Com o melhor conhecimento da fisiopatologia da sepse foram desenvolvidos modelos prognósticos, como APACHE (*Acute Physiological and Chronic Health Evaluation II*) e SOFA (*Sepsis - Related Organ Failure Assessment*), para se classificar a gravidade do quadro séptico. O que também possibilitou modificação em protocolos terapêuticos.

Não se pode negar os avanços em relação ao diagnóstico mais precoce, ao rastreamento microbiano mais eficaz que possibilita o rápido início do tratamento e ao uso mais otimizado das variáveis hemodinâmicas e das técnicas de suporte orgânico (Benjamin *et al.*, 2004). Avança-se também para um controle metabólico mais eficaz onde compreende-se a importância do controle glicêmico, diagnosticando e tratando mais frequentemente a insuficiência adrenal relativa (Van den Berghe *et al.*, 2001; Annane *et al.*, 2002). A utilização da ventilação mecânica e terapia nutricional estão igualmente mais bem administradas aos pacientes graves (Wheeler *et al.*, 1999; Knobel *et al.*, 2000). Surgem frequentemente novos fármacos que visam interferir nas cascatas inflamatória e da coagulação, minimizando os malefícios por elas causados (Hotchkiss e Karl, 2003)

Desta forma, com o aumento dos pacientes que sobrevivem a esta patologia, que é o principal objetivo da campanha mundial de sobrevivência na sepse (*Survival Sepsis Campaign*), deve ocorrer uma redução na mortalidade de 25% até 2010 (Sales Júnior *et al.*, 2006).

Segundo estudo realizado por, Bagshaw *et al.* (2005), a incidência de morte no primeiro ano pós sepse ocorre em cerca de 10% dos pacientes acometidos. Porém, o estudo não descreve as causas da morte destes pacientes. Contudo, fica claro que o paciente após sepse possui fragilidades, o que leva-se a pensar que

alterações na resposta imune e danos em órgãos vitais, ocorridos durante a sepse, aumentam a probabilidade de morte destes pacientes poucos anos após a sepse.

A sepse possui características fisiopatológicas diferentes de acordo com o momento analisado, podendo ser aguda (instalação do quadro séptico) e crônica (recuperação do quadro séptico). Os estudos atuais não permitem a compreensão da trajetória completa da doença e, principalmente, desconhecemos os mecanismos de morte na fase crônica.

O modelo CLP, utilizado em nosso estudo, causa peritonite polimicrobiana, realidade bem similar à conhecida em humanos. Assim como também reproduz a taxa de mortalidade, cerca de 30% dos pacientes. Por isso, o modelo pareceu ser o mais indicado para a mimetização da sepse humana e assim eventualmente permitir, em nosso estudo, uma melhor compreensão de seus mecanismos no que diz respeito à função renal.

6.1 Avaliação Inflamatória Renal

A fisiopatologia da sepse está relacionada a uma interação complexa entre o hospedeiro e o microorganismo infectante. São vários os processos envolvidos sendo que o principal está relacionado à ativação de células inflamatórias tais como os leucócitos, macrófagos teciduais, células dendríticas e eosinófilos. Estas, por sua vez, desencadeiam ativação pertinente do endotélio, do sistema imune, de citocinas pró e antiinflamatórias e do sistema de coagulação (Cohen, 2004).

A primeira linha de defesa contra tais infecções é ativada quando um patógeno atravessa a barreira natural do hospedeiro. Dentre as células efetoras do sistema imune inato, as mais importantes são os neutrófilos e macrófagos, que são capazes de fagocitar e digerir os patógenos, secretar citocinas e quimiocinas, além de coordenar mecanismos adicionais de resposta do hospedeiro. O fato de expor os neutrófilos a bactérias ou produtos bacterianos ativa essas células como parte da resposta inflamatória, obtendo como resultado final a retirada do patógeno (Janeway e Medzhitov, 2002).

Em nosso estudo, a quantificação de neutrófilos no tecido renal foi feita, indiretamente, através da atividade da mieloperoxidase (MPO). A sepse aumentou a atividade dessa enzima, aumento este, já observado 24 h após a indução e que permanece até o 2º dia. Desta forma, nota-se que há participação ativa do rim no

quadro séptico, sendo que ele não só sofre as conseqüências da doença sistêmica, mas também apresenta um processo inflamatório local.

Estes resultados são similares aos obtidos por Ueki *et al.* (2005), onde foi observado aumento da atividade de MPO em tecidos renal, pulmonar, diafragma e fígado. Allcock *et al.* (2001), utilizando o modelo de sepse induzida pelo LPS, também detectaram aumento de neutrófilos no rim através atividade da MPO. Em estudos realizados com o modelo de isquemia e reperfusão foi sugerido a participação dos neutrófilos na patogênese e no agravamento da disfunção renal com ativação neutrofílica e infiltração podendo ser regida por outros leucócitos (Sener *et al.*, 2005).

A resposta dos órgãos à sepse é heterogênea. Como descrito por Andrades *et al.* (2005) alguns apresentam maiores níveis de danos celulares sendo que estes danos aparecem mais precocemente que em outros órgãos, como acontece com os rins e pulmões.

Os animais *Sham* apresentaram aumento da MPO somente no primeiro dia, provavelmente, em decorrência do procedimento cirúrgico onde houve exposição da alça intestinal. Este aumento, além de não ter sido significativo, foi revertido após 48 h.

Kuligowski *et al.* (2006) chamam a atenção para o fato de que a microvasculatura glomerular é essencialmente um plexo de capilares e que, na maioria dos leitos capilares, não ocorre recrutamento de leucócitos. Quando ocorre, os leucócitos causam deformações no estreito trânsito glomerular. Soma-se a isto a complexidade desta interação, que é reforçada pelo papel fundamental das plaquetas que se acumulam nos capilares glomerulares e fornecem uma fonte de moléculas de aderência tecidual. Este é um dos fatores que contribui, possivelmente, para a glomerulonefrite desenvolvida pelos animais submetidos à sepse.

O TNF α é o primeiro mediador inflamatório a ser produzido em resposta a um estímulo infeccioso, sendo considerado um mediador primário do sistema imune inato, o qual é crucial para induzir proteção local (Van Deventer *et al.*, 1990; Ulloa e Tracey, 2005). Quantidades mínimas de TNF α contribuem para a defesa do hospedeiro por limitar a propagação de organismos patogênicos para a circulação sanguínea. Este fenômeno é observado durante uma resposta inflamatória bem sucedida, na qual a duração e a magnitude da liberação de TNF α não são exacerbadas (Tracey, 2002; Ulloa e Tracey, 2005).

No entanto, quando a produção é excessiva e prolongada, esta se torna deletéria para o organismo (Netea *et al.*, 2003), uma vez que supera a regulação normal da resposta imune induzindo ativação de outras citocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, os quais promovem inflamação e lesão tecidual, potencialmente, letal (Tracey, 2002; Ulloa e Tracey, 2005).

Esta situação é especialmente notada na sepse grave, onde há excessiva produção desta citocina pró-inflamatória, a qual causa aumento da permeabilidade capilar, provoca lesão tecidual e morte por falência orgânica (Tracey, 2002; Ulloa e Tracey, 2005).

Segundo Cunneen e Cartwright (2004), durante o processo infeccioso, o nível sérico de TNF α eleva-se durante os primeiros 30 a 90 min após a exposição ao LPS com pico entre 3 e 4 h. Em nosso estudo, inicialmente, o TNF α foi quantificado no plasma 24 h após a indução da sepse, mas o mesmo encontrava-se em concentração tão baixa que não foi detectável pelo método utilizado. Segundo Küster *et al.* (1998), em estudo multicêntrico com 101 recém-nascidos apresentando sepse neonatal tardia, os níveis de citocinas apresentam-se elevados dois dias antes de ser feito o diagnóstico de sepse. Isto poderia, pelo menos em parte, explicar a não detecção de TNF α plasmático (concentração muito baixa) em nosso estudo. Isto, provavelmente, ocorre devido à meia vida fugaz desta citocina em pacientes que evoluem bem, ou seja, pacientes que normalmente sobrevivem à sepse (Küster *et al.*, 1998).

Em nosso estudo, o conteúdo renal de RNAm para transcrição de TNF α não estava aumentado em nenhum dos momentos avaliados. Provavelmente, esse aumento de RNAm poderia ter ocorrido em período anterior ao primeiro período analisado (durante as 24 horas iniciais pós-sepse), uma vez que o TNF α tem função inicial no processo inflamatório e a inflamação gerada no tecido renal já teria sido desencadeada. Soma-se a isto, o fato de que o TNF α estava aumentado tanto no rim, às 24 h pós-sepse, como na urina, a partir do 5^o dia. Esta seqüência indica que a inflamação no tecido renal começaria imediatamente após a indução e permaneceria por dias.

Estudos anteriores mostraram que há aumento significativo na expressão de RNAm para TNF- α em período de tempo tão curto quanto 30 min, em resposta a diferentes estímulos como angiotensina II ou oclusão coronariana (Taishi *et al.*, 2008; Francis *et al.*, 2004; Kalra *et al.*, 2002). Além disso, existe uma propriedade

conhecida da citocina para amplificar sua própria secreção em um “feed-forward” (Chrousos, 2000). Através de um estudo bem organizado e abrangente, Taishi *et al.* (2008) relataram que o TNF- α aumentou significativamente a expressão de RNAm para IL-1 β (56 vezes), TNF- α (43 vezes) e IL-6 (5 vezes) em 30 min, em cultura de células hipotalâmicas de ratos. O mesmo tratamento em cultura de células corticais aumentou os níveis de RNAm para IL-1 β (> 30 vezes), TNF- α (> 50 vezes) e IL-6 (30 vezes) também em 30 min. Estes dados sugerem que o TNF- α pode aumentar a sua própria expressão, bem como de outras citocinas em um período curto de tempo.

Shahid *et al.* (2008) demonstraram que a administração aguda da pró-citocina TNF α , em camundongos, promoveu profundas alterações renais, o que resultou em decréscimos no fluxo plasmático renal (FPR) e no ritmo de filtração glomerular (RFG), mas causou aumento no fluxo urinário e na excreção de sódio sem, no entanto, alterar a pressão arterial. Esta observação está de acordo com os resultados do nosso trabalho.

Segundo estudo realizado por Zhang *et al.* (2004), o TNF α estimula a ação de mediadores inflamatórios solúveis, como a prostaglandina E₂, no SNC. Estes iniciam mecanismos neurais que alteram a atividade nervosa simpática, levando a mudanças na pressão arterial e também no fluxo urinário. No entanto, no nosso estudo não houve alteração na pressão arterial após 48 horas de indução, sugerindo que a partir deste momento não houve estimulação da atividade simpática em grau suficiente para influenciar a hemodinâmica e a função renal.

Em nosso estudo, observamos uma drástica queda do RFG, já a partir de 24 h de sepse. Haque e Majid (2004) verificaram que o TNF α reduziu tanto o FPR, como o RFG em ratos sendo, a redução do RFG, parcialmente atenuada pelo L-NAME. No entanto, a redução do FPR foi reforçada, indicando que, na condição de inibição da NOS, o TNF α tem uma influência semelhante nas resistências pré- e pós-glomerulares, o que teria auxiliado na manutenção do RFG, em condições normais, mesmo que tenha havido queda acentuada no FPR. Sabe-se que a magnitude do RFG depende do equilíbrio entre as forças de filtração, portanto, das resistências vasculares pré- e pós-glomerular (Navar *et al.*, 1993).

No presente estudo, foi verificada natriurese 48 h após indução da sepse, apesar do efeito vasoconstritor e de hipofiltração do TNF α . No entanto, parece que este efeito do TNF- α foi devido à sua influência direta sobre a reabsorção tubular de

sódio aumentando a fração de excreção de mesmo. Estudo anterior, *in vitro*, relatou que o TNF- α exerce ação inibitória direta sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, Na⁺,K⁺,2Cl⁻-ATPase-cotransporte e canal epitelial de sódio (EnaC) no córtex e medula renal (Kreydiyyeh e Markossian, 2006). Assim, é concebível que um possível efeito natriurético do TNF α , em nosso estudo, poderia ser devido à sua ação inibitória direta sobre transportadores tubulares de sódio. Porém, estudos que avaliem esses transportadores de forma mais direta são imprescindíveis.

Assim como ocorreu com o TNF α , a IL-6, no rim, mostrou-se aumentada no 1^o dia pós-sepse e na urina, no 5^o dia. Níveis renal e urinário de IL-6 têm sido relatados em experimentos envolvendo endotoxemia. Por este motivo, a IL-6 é utilizada, tem sido usada na prática clínica, como marcador de doenças inflamatórias renais como pielonefrites e situações de nefrotoxicidade (Kayama *et al.*, 1997).

A IL-6 também é considerada um importante marcador de resposta inflamatória sistêmica, pois, frente a um agravo infeccioso, alcança rapidamente picos altos de concentração sérica, o que a caracteriza como uma citocina de alarme à infecção (Casey, 2000; Ceccon, 2002). Aparentemente, a IL-6 não é um marcador direto da sepse, pois reflete os efeitos em rede da produção prévia da IL-1 β e TNF α (Dinarello, 1997; Casey, 2000).

Ao contrário do TNF α , os níveis séricos de IL-6 estão significativamente elevados e sustentados por tempo mais longo, na maioria dos pacientes sépticos, refletindo a intensidade da resposta inflamatória (Loisa *et al.*, 2003). Diferentemente, em nosso estudo, a IL-6 assim como o TNF α não foram detectados no plasma.

A participação da IL-6 na patogênese da insuficiência renal, decorrente da sepse, parece ocorrer de maneira similar à do TNF α , porém, poucos estudos tentam explicar sua participação nas alterações glomerulares e tubulares. A IL-6 é o parâmetro mais utilizado na clínica, devido à meia-vida plasmática baixa do TNF α (Bellomo *et al.*, 2007; Horner *et al.*, 2007; Lakhmir *et al.*, 2007).

Um aumento da expressão renal de RNAm para TGF β 1 foi observado, em nosso estudo, no 20^o dia após a indução da sepse. O TGF β 1 tem sido considerado um dos fatores de crescimento capaz de induzir modificações no fenótipo e na função de células mesangiais, e por isso, tem sido considerado o principal mecanismo fisiopatogênico no rim (Roelofs *et al.*, 1998). Enquanto a expansão de matriz mesangial e intersticial podem resultar da ativação direta da rede de sinalização do TGF β , em células mesangiais e miofibroblastos, a cascata de

sinalização do TGF β pode ainda iniciar efetores pró-apoptóticos em diversas células renais (Schiffer et al., 2001; Schuster et al., 2002), inclusive podócitos, resultando em depleção podocitária que pode preceder a glomeruloesclerose (Coimbra et al., 2000). O TGF β pode também estar envolvido na transdiferenciação epitélio-mesenquimal, a qual tem sido implicada no acúmulo de miofibroblastos e atrofia tubular, que são fatores que contribuem para a fibrose renal (Zeisberg *et al.*, 2003).

A expansão da matriz mesangial e espessamento da membrana basal glomerular podem ser devido ao aumento do acúmulo de proteínas normalmente presentes nestas estruturas (Mason e Wahab, 2003). Aumento na síntese de colágeno, laminina e fibronectina tem sido demonstrado em modelos humanos e experimentais de nefropatias (Mason e Wahab, 2003). Além disso, o TGF β 1 tem sido apontado como o principal mediador do aumento destas proteínas de matriz extracelular na nefropatia diabética (Massague e Chen, 2000; Bottinger e Bitzer, 2002). Portanto, a glomerulosclerose é um processo pelo qual o glomérulo normal e funcional é substituído por tecido fibroso, acumulando depósitos na matriz extracelular (MEC). Isto representa uma via comum para a perda primária de funcionamento de glomérulos associada a doenças díspares como glomerulonefrite crônica, uropatia obstrutiva e infecção retroviral (Schnaper *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, foram observadas alterações na morfometria glomerular, como aumento da cápsula de Bowman e do tufo glomerular, a partir do 5^o dia. Esta análise quantitativa revela, dentro de uma mesma população, se estruturas assumem tamanhos e formas diferentes decorrentes de mudanças no ambiente como, por exemplo, acúmulo de células, ação de citocinas, etc. O resultado da morfometria glomerular somado ao aumento da expressão gênica de TGF β 1 indicam, de forma consistente, a ocorrência de glomeruloesclerose.

Na avaliação histopatológica de rins dos ratos CLP foi possível observar espessamento da membrana basal e expansão da matriz mesangial bem como a presença de alguns glomérulos já esclerosados. Com estes dados, pode-se afirmar que o rim encontra-se em pleno processo de instalação de uma doença, que poderá evoluir para o quadro crônico, pois as alterações notadas são características de glomerulonefrite. Portanto, alguma intervenção poderá ser feita, neste momento, para se minimizar esta evolução da doença para uma provável insuficiência renal crônica (IRC).

No presente estudo, nenhuma alteração na morfométrica tubular foi observada. Este fato pode ser devido à presença de alguns túbulos proximais estarem hipertrofiados e outros atrofiados o que, na média da avaliação morfométrica, não fornece alteração detectável. No entanto, o aumento da excreção urinária da gama glutamil transferase, enzima componente da borda em escova, é um indicativo de necrose em células tubulares proximais (Ali, 1995). Na análise histopatológica também foi possível visualizar núcleos picnóticos e maior vacuolização de células tubulares. Desta forma, os nossos dados indicam que, embora a sepse tenha produzido lesão tubular, esta não apresentou em um padrão único, ou seja, teve perfil heterogêneo.

Embora a necrose tubular aguda seja a evidência mais comum de lesão renal na sepse (Camusi, 1998), este tipo de lesão histológica nem sempre ocorre na insuficiência renal aguda devido à sepse. Como sugerido por Langenberg (2008), em um estudo rigoroso das alterações histológicas que ocorrem no rim, nenhum padrão histopatológico tubular único pode ser confiavelmente associado à insuficiência renal aguda séptica.

6.2 Avaliação da Função Renal

A sepse é uma patologia bastante estudada e o envolvimento do rim, nesta síndrome, é consenso geral (Thijs e Thijs, 1998). Porém, estudos que avaliem a função renal por um período mais longo, no pós sepse, são inexistentes.

As alterações renais são decorrentes do processo inflamatório e das abruptas mudanças hemodinâmicas. Estes dois fenômenos, inflamatório e hemodinâmico, ocorrem simultaneamente e podem interagir-se potenciando ora um efeito, ora outro efeito.

Em nosso estudo, a indução de sepse promoveu alterações na função renal já a partir de 24 h de observação, sendo que as mesmas permaneceram até o último dia de avaliação. Isto indica estar havendo uma progressão da doença mesmo com a melhora do quadro séptico.

Alterações como diminuição do RFG, aumento da proteinúria, aumento na fração de excreção de sódio e na de potássio sem alteração no *clearance* osmolar e no *clearance* de água livre foram observadas durante todo o período avaliado (20

dias). Estas alterações na função renal ocorrem numa tentativa de manter a homeostasia do organismo.

A pressão arterial sistólica (PAS) nos ratos do grupo CLP estava drasticamente diminuída 24 h após indução da sepse, provavelmente, devido a uma intensa vasodilatação que, neste tempo, já ocorre. Nos tempos subsequentes, a PAS apresentou valores semelhantes aos dos ratos dos grupos Controle e *Sham*. Já o fluxo urinário, bastante aumentado 24 h pós-sepse, permaneceu elevado em todos os outros dias avaliados, o que pode ser explicado pelo aumento intenso da excreção urinária de proteínas. O fato de que o FU esteve igualmente elevado em todos os dias avaliados (Fig. 12) e que a concentração urinárias de sódio e de potássio (Tab. 2) estavam acentuadamente diminuídas no 1º dia pós-sepse, indica que estaria havendo inicialmente (1º dia) uma reabsorção aumentada desses eletrólitos, o que poderia corrigir a queda na PAS.

O hematócrito nos ratos CLP também está aumentado, o que caracteriza um estado de desidratação intensa.

Segundo Cavazzoni e Dellinger (2006), o perfil hemodinâmico da sepse grave e choque séptico é inicialmente caracterizado por componentes hipovolêmicos, cardiogênicos e hipoperfusão. Nas fases iniciais de sepse, aumenta o vazamento capilar venoso e há aumento da capacitância o que resultará em diminuição do retorno venoso para o coração. As citocinas liberadas também podem causar depressão miocárdica direta. Para se evitar o choque cardiogênico, a volemia deve ser restabelecida. Isto explicaria, pelo menos parcialmente, a diminuição inicial (1º dia) nas concentrações urinárias de sódio e de potássio e aumento na ingestão de água nos ratos que sobreviveram à sepse, em nosso estudo. Observação interessante foi que a mortalidade aumentou para 60% dentro do grupo de ratos CLP que não aumentaram a ingestão de água. Esta observação está de acordo com o relato de que um suporte fluidoterápico melhor e mais adequado diminuiu a taxa de mortalidade entre os pacientes sépticos (Hotchkiss *et al.*, 2003).

O restabelecimento da hipovolemia normalmente resulta em um estado de resposta hiperdinâmica. Porém, sinais de hipoperfusão tecidual podem persistir. Isso é, muitas vezes, chamado 'choque distributivo', podendo estar relacionado à má distribuição do fluxo sanguíneo regional (esplâncnica, mesentérica e renal) ou em nível microvascular e/ou uma incapacidade para utilizar o oxigênio

celular, apesar do fornecimento de oxigênio estar adequado (hipóxia citotóxica) (Cavazzoni e Dellinger, 2006). Tais alterações podem levar à diminuição do RFG e à lesão da microvasculatura glomerular desenvolvendo a proteinúria.

Em um estudo desenvolvido por Langenberg (2007), onde se utilizou ratos desenvolvendo um estado hiperdinâmico circulatório semelhante ao observado em pacientes sépticos desenvolvendo IRA, mostrou que a recuperação da função renal pode ocorrer em paralelo com vasoconstrição vascular renal e diminuição do fluxo sanguíneo renal, em 48 h de observação. Em nosso estudo, não foi observado melhora do quadro em 20 dias de avaliação permanecendo, não só o RFG diminuído, mas também ocorrendo aumento nas concentrações plasmáticas de creatinina e uréia, assim como aumento da relação da proteína e creatinina urinárias, que nos fornece uma estimativa da progressão da lesão glomerular (Schwab, 1987; Ginsberg, 1983). Tais conflitos, podem ser explicados devido às diferenças nos modelos experimentais utilizados que, no estudo de Langenberg (2007), foi o modelo de infusão de *E. coli* por via intravenosa, o que poderá gerar um quadro séptico extremamente diferente daquele induzido pelo modelo CLP.

Com relação à função tubular, Langenberg (2007) relatou que houve uma recuperação tubular dentro de 48 h após o tratamento com gentamicina, tornando improvável que tenha ocorrido a necrose tubular grave.

Pouco se sabe sobre a fisiopatologia endotoxêmica da disfunção tubular onde ocorre falha na concentração de urina e um aumento da fração de excreção de sódio (Schmidt *et al.*, 2007). Os poucos estudos a respeito atribuem a disfunção tubular às citocinas, quais deterioram as bombas trocadoras, como já discutido anteriormente.

Nosso estudo também revelou um aumento na fração de excreção de sódio, a partir do 5º dia de avaliação. Este aumento poderia ser explicado caso houvesse aumento da secreção de aldosterona. Segundo Brown, em revisão recente (2008), a aldosterona está relacionada com a inflamação e a instalação da fibrose, por desencadear aumento de espécies reativas de oxigênio. Deste modo, em nosso estudo, um possível aumento de aldosterona poderia ser mais mais um estímulo para a síntese de TGFβ1 e outros fatores pró-fibróticos.

Por fim, afirmamos que muitos aspectos sobre a insuficiência renal decorrente da sepse devem ser melhor estudados. Os aspectos hemodinâmicos e inflamatórios devem ser bem investigados no rim, tanto por suas ações no glomérulo quanto nos

túbulos. Deve-se sempre levar em consideração, que o paciente em sepse apresenta peculiaridades inerentes ao estágio de desenvolvimento em que a sepse é diagnosticada (mais precoce ou mais tardio) e assim os pacientes que sobrevivem sofreram as consequências das manifestações a que foram submetidos. Desta forma, deve-se ter cautela, por exemplo, ao considerar estudos sobre indivíduos durante a sepse e indivíduos que a ela sobreviveram, extrapolando conclusões como se as manifestações fossem similares. Condutas terapêuticas novas também devem ser buscadas para minimizar a progressão de lesão renal.

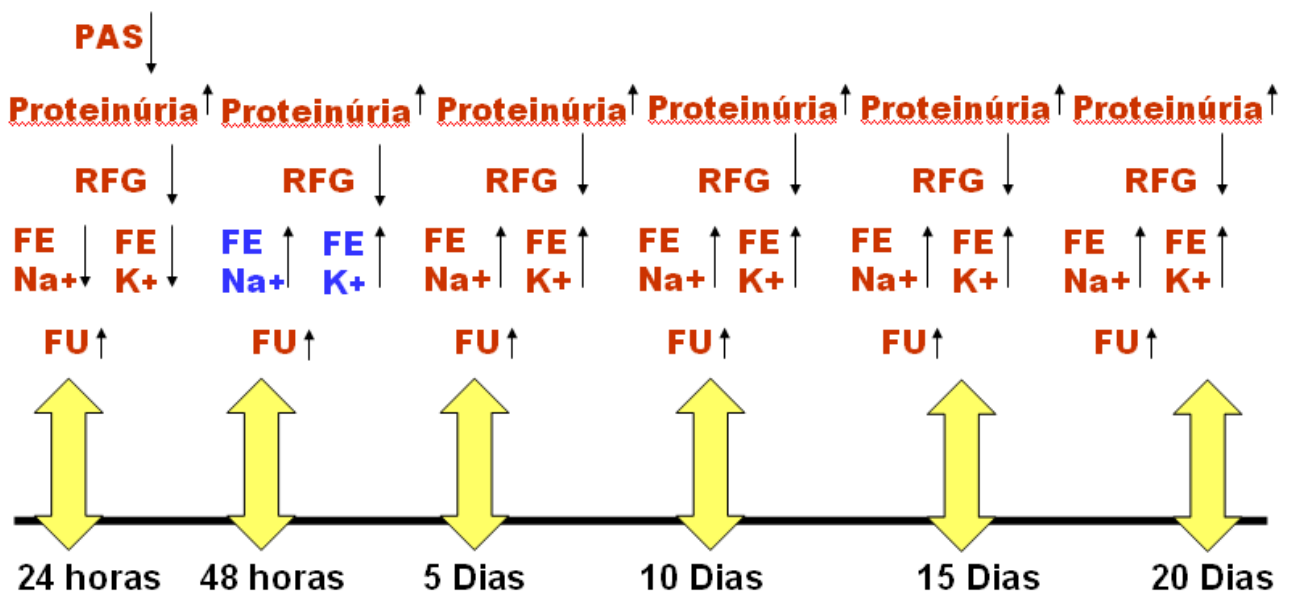


Figura 30. Esquema resumindo as alterações renais induzidas pela sepse pelo modelo CLP ao longo de 20 dias de avaliação.

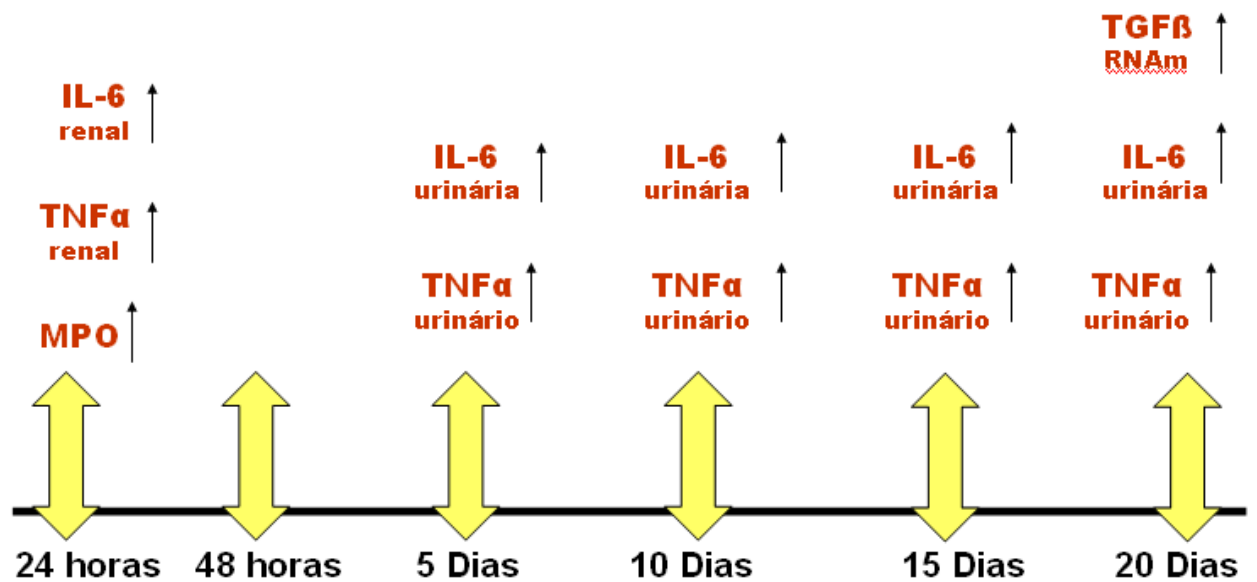


Figura 31. Esquema resumindo as alterações inflamatórias renais induzidas pela sepse pelo modelo CLP ao longo de 20 dias de avaliação.

7 CONCLUSÕES

- A sepse promove profundas alterações na função renal, que podem ser irreversíveis;
- As alterações inflamatórias renais persistem agravando a disfunção renal;
- A insuficiência renal desenvolvida devido à sepse poderá se tornar crônica;
- Mais estudos são necessários para melhor compreensão das alterações renais decorrentes da sepse, principalmente quanto a função tubular.

8. Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. IN: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Cellular and molecular immunology*. 5° ed. Philadelphia. Elsevier. p. 243-274, 2005.

ALI, B. H. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some research. *Gen Pharmac*. 26, 1477-1487, 1995.

[ANDRADES, M.](#); [RITTER, C.](#); [MOREIRA, J. C.](#); [DAL-PIZZOL, F.](#) Oxidative Parameters Differences During Non-Lethal And Lethal Sepsis Development. [J Surg Res](#). v.125, n.1, p.68-72, 2005.

ANGUS, D. C.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKI, M; R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. v.29, p.1303-1310, 2001.

ANTONELLI, M.; LEVY, M.; ANDREWS, P. J.; CHSTRE, J.; HUDSON, L. D.; MANTHOUS, C.; MEDURI, G. U.; MORENO, R. P.; PUTENSEN, C.; STEWART, TORRES, A. Hemodynamic monitoring in shock and implications for management:International Consensus Conference, Paris, France, 27-28 April 2006. *Int. Care Med*, v. 33, p.575-590, 2007.

AYALA, A.; CHUNG, C. S.; GRUTKOSKI, P. S.; SONG, G. Y. Mechanisms of immune resolution. *Crit Care Med*. v. 31, n. 8, p. 558-571, 2003.

BAGBY, G. J.; PLESSALA, K. J.; WILSON, L. A.; THOMPSON, J. J.; NELSON, S. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis. *J Infect Dis*. n. 163, p. 83-88, 1991.

BAGSHAW, S. M.; LAUPLAND, K. B.; DOIG, C. J.; MORTIS, G.; FICK, G. H.; MUCENSKI, M.; GODINEZ-LUNA, T.; SVENSON, L. W.; ROSENAL, T. Prognosis for longterm survival and renal recovery in critically ill patients with severe acute renal failure: a population-based study. *Crit Care*. n. 9, p.700-709, 2005.

BAKER, C. C.; CHAUDRY, I. H.; GAINES, H. O.; BAUE, A. E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery*. v. 94, p. 331- 335, 1983.

BEISHUIZEN, A.; VERMES, I.; HAANEN, C. Endogenous mediators in sepsis and and shock. *Crit. Care Med*. v. 27, p.1369-1377, 1999.

BELLOMO R, WAN L, LANGENBERG C, MAY C. Septic acute kidney injury: new concepts. *Nephron Exp Nephrol*. n. 109, v. 4, p. 95-100, 2008.

BELLOMO, R. The epidemiology of acute renal failure: 1975 x 2005. *Current Opinion in Critical Opinion in Critical Care*. n. 12, v. 6, p. 557-560, 2006.

BERNARD, G. R.; VINCENT, J. L.; LATERRE, P. F. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis . *N Engl J Med*, v. 344, p.699-709, 2003.

BOCHUD, P. Y.; CALANDRA, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ*. v. 326; p. 262-266, 2003.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med*. v.115, p. 457-469, 1991.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUSS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. 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*. v. 101, p. 1644-1655, 1992.

BRIVET, F. G.; KLEINKNECHT, D. J.; LOIRAT, P.; LANDAIS, P. J. Acute renal failure in intensive care units: causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. *Crit Care Med*. v. 24, p.192-198, 1996.

[BROOKS, H. F.](#); [OSABUTEY, C. K.](#); [MOSS, R. F.](#); [ANDREWS, P. L.](#); [DAVIES, D. C.](#) Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab Brain Dis*. v. 22, n.3, p.353-73, 2007.

CAMUSI, G.; RONCO, C.; MONTRUCCHIO, G.; PICCOLI, G. Role of soluble mediators in sepsis and renal failure. *Kidney International*. v. 54, p. 38-42, 1998.

CAO, C. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPZ rat brain. *Am J Physiol*. v. 272, p. 1712-1725.

CARVALHO, P. R. A; TROTTA, E. A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. *J de Ped*, v.79, 2003.

CASEY, L. C.; BALK, R. A.; BONE, R.; C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlates with survival in patients with the sepsis syndrome. *Annals of Internal Medicine*. v. 119; p. 771-778, 1993.

CAVAZZONI, S. L. Z.; DELLINGER, R. P. Hemodynamic optimization of sepsis-induced tissue hypoperfusion. *Critical Care*. n.10, v. 3, p.118-126, 2006.

CHROUSOS G. P. The stress response and immune function: clinical implications. The 1999 Novera H. Spector Lecture. *Ann NY Acad Sci* 917: 38–67, 2000.

CUNNEEN, J.; CARTWRIGHT, M. The puzzle of sepsis. Fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. *AACN Clinical Issue*. n. 15, p. 18-44, 2004.

DAS, U.; N. Critical advances in septicemia and septic shock. *Crit Care Med*. v. 4, p. 290-296, 2000.

DE MENDONÇA, A. VINCENT, J. L.; SUTER, P. M.; MORENO, R.; DEARDEN, N. M.; ANTONELLI, M. Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by SOFA score. *Intensive Care Medicine*. n. 26, v. 7, p. 915-921, 2000.

DERKX, B.; MARCHANT, A.; GOLDMAN, M.; BIJLMER, R.; VAN DEVENTER, S. High levels of interleukin-10 during the initial phase of fulminant meningococcal septic shock. *J Infect Dis*. n.171, p. 229-232, 1995.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. v. 112, p. 321S-329S, 1997.

EVANS, T.; CARPENTER, A.; KINDERMAN, H.; COHEN, J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ. Shock.*, 41:77-81, 1993.

FRANCIS J, CHU Y, JOHNSON AK, WEISS RM, FELDER RB. Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H2264–H2271, 2004.

FUJISHIMA, S.; AIKAWA, N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive Care Med.* v. 33, p. 440-444, 1995.

GINSBERG, J. M.; CHANG, B. S.; MATARESE, R. A.; GARELLA, S. Use of single voided urine sample to estimate quantitative proteinuria. *N Engl J Med.* n. 309, v. 25, p.1543-1546, 1983.

GOGOS, C. A.; DROSOU, E.; BASSARIS, H. P.; SKOUTELIS, A. Pro- versus antiinflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for and future therapeutic optins. *J Infect Dis.* n. 181, v. 1, p. 176-180, 2000.

GROND, J.; VAN GOOR, H.; ERKELENS, W.; ELEMA, J.D. Glomerular sclerosis in Wistar rats: analysis of its variable occurrence after unilateral nephrectomy. *Br. J. Exp. Pathol.* v.67, p.473-479, 1986b

HALLMAN, M.; RAMET, M.; EZEKOWITZ, R. A. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res.* n. 50, v. 1, p. 325-21, 2001.

HAQUE, M. Z.; MAJID, D. S. Assessment of renal functional phenotype in mice lacking gp91PHOX subunit of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 43: 335–40, 2004.

HAUSER, B.; BRACHT, H.; MATEJOVIC, M.; RADERMACHER, P.; VENKATESH, B. Nitric Oxide Synthase Inhibition in Sepsis? Lessons Learned from Large-Animal Studies. *Anesth. Analg.*, 101: 488–98, 2005.

HEEG, K.; DALPKE, A. TLR-induced negative regulatory circuits: Role of suppressor of cytokine signaling (SOCs) proteins in innate immunity. *Vaccine.* n. 21, v. 2, p. S61-S67, 2003.

HOLLENBERG, S. M.; AHRENS, T. S.; ANNANE, D.; ASTIZ, M. E.; CHALFIN, D. B.; DASTA, INCE, C.; SINNASAPPEL, M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Critical Care Medicine.* v. 27, p. 1369-1377, 1999.

HÖRNE, C.; SCHUSTER, S.; PLACHKY, J.; HOFER, S.; MARTIN, E.; WEIGAND, M. A. Hemofiltration and immune response in severe sepsis. *J Surg Res.* n. 142, v. 1, p. 59-65, 2007.

HOSTETTER, T. H.; OLSON, J. L.; RENNKE, H. G.; VENKATACHALAM, M. A.; BRENNER, B. M. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *J Am Soc Nephrol.* v.12, p. 1315–1325, 2001.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E.; The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* v. 348, p. 138-150, 2003.

JAFFE, M. J. *Physiol. Chem.* v. 10 n. 381, 1886.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*. v.1589, p. 1-13, 2002.

KALRA, D.; SIVASUBRAMANIAN, N.; MANN, D. L. Angiotensin II induces tumor necrosis factor biosynthesis in the adult mammalian heart through a protein kinase C-dependent pathway. *Circulation* 105: 2198–2205, 2002.

KAYAMA, F.; TAKIHIKO, Y.; YASUSHI, K.; TAKASHI, M.; LUSTER, M. Pro-inflammatory cytokines and interleukin in the renal response to bacterial endotoxin. *Cytokine*. v. 8, p. 577-584, 2008.

KOCH, T. Origin and mediators involved in sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. *Kidney Int Suppl*. v. 53, p.66-69, 1998.

KREYDIYYEH, S. I.; MARKOSSIAN, S. Tumor necrosis factor alpha down-regulates the Na⁺-K⁺ ATPase and the Na⁺K⁺2Cl⁻ cotransporter in the kidney cortex and medulla. *Cytokine* 33: 138–144, 2006.

Kuhlmann, M. K. New Experimental Model of Acute Renal Failure and Sepsis in Rats *J Parenter Enteral Nutr*. v.18: 477-485, 1994.

LAFERTY, H.M.; BRENNER, B.M. Are glomerular hypertension and hypertrophy independent risk factors for progression of renal disease? *Semin. Nephrol*. v. 10, p. 294-304, 1990.

LAKHMIR, S.; MICHAEL, G.; SENEFF, R.; NELSON, WILLIAMS. Elevated plasma concentrations of IL-6 and elevated APACHE II score predict acute kidney injury in patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. N. 12, p. 22-30, 2007.

LANDENBERG, C.; BAGSHAW, S. M.; C. N. MAY.; BELLOMO, R. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review. *Critical Care*. n.38, p. 12-17, 2003.

LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHAL, J. C.; ABRAHAM, E. ; ANGUS, D.; COOK, D.; COHEN, J.; OPAL, S. M.; VICENT J. L.; RAMSAY, G. for the international sepsis definitions conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Critical Care Medicine*. n. 31, p. 1250-6, 2003.

LIANGOS, O.; WALD, R.; O'BELL, J. W.; PRICE, L.; PEREIRA, B. J.; JABER, B. L.. Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey. *Clin J Am Soc Nephrol*. v.1, p. 43-51, 2006.

LOISA, P.; RINNE, T.; LAINE, S.; HURME, M.; KAUKINEN, S. Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand*. v. 47, p.319-325, 2003.

LOWRY, S. F. Cytokines mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg*. v. 128, p. 1235-1245, 1993.

MACKENZIE, H. S.; BRENNER, B. M. Current strategies for retarding progression of renal progression of renal disease. *American Journal Kidney Disease*. v. 31, p. 161-170, 1998.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Innate immunity. *N Eng J Med*. v. 345, v. 5, p. 338-344, 2000.

NASH, K.; HAFEEZ, A.; HOU, S. Hospital-acquired renal insufficiency. *American Journal of Kidney Disease*. n. 39, n. 5, p. 930-936, 1996.

NAVAR, L. G.; INSCHO, E. W.; MAJID, S. A., Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev* 76: 425–536, 1996.

NETEA, M. G.; VAN DER MEER, J. W. M.; VAN DEUREN, M.; KULLBERG, B. J. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol.* v. 24, p. 254-258, 2003.

NG, P. C. Diagnostic marker of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* v. 89, p. 229-235, 2004.

NIEDERMAN, M.S.; FEIN, A.M. Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia. A common clinical sequence. *Clin. Chest. Med.*, 11: 633-656, 1990.

OCHOA, J.B.; UDEKWU, A.O.; BILLIAR, T.R.; CURRAN, R.D.; CERRA, F.R.; SIMONS, R.L.; PEITZMAN, A.B. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann. Surg.*, 214(5): 621-626, 1991.

OPAL, S. M. The host response to endotoxin, antilipoplysaccharide strategies and the management of severe sepsis. *Int. J. Med. Microbiol.*, 297(5): 365-77, 2007.

OPAL, S. M.; ESMON, C.T. Bench-to-beside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogens of sepsis. *Crit Care.* v. 7, p. 23-38, 2003.

OSUCHOWSKI, M. F.; WELCH, K.; SIDDIQUI, J.; REMICK, D. G. Circulating Cytokine/Inhibitor Profiles Reshape the Understanding of the SIRS/CARS Continuum in Sepsis and Predict Mortality. *J Immunol.* v. 177, p. 1967-1974, 2006.

PARRILLO, J. E.; PARKER, M. M.; NATANSON, C.; SUFFREDINI, A. F.; DANNER, R. L.; CUNNION, R. E.; OGNIBENE, F. P.. Septic shock in humans. advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Annals of Internal Medicine.* v.113, n. 3, p. 227-242, 1990.

PARRILO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Eng J Med.* v. 328, p.1471-1477, 1993.

PEREIRA-JUNIOR, G. A.; MARSON, F.; ABEID, M.; OSTINI, F. M.; SOUZA, S. M.; BASIL-FILHO, A. Pathogenetic mechanisms of sepsis and their therapeutics implications. *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto*, v. 31, p. 349-362, 1998.

POLL, T.V.D.; OPAL, S.M. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infec. Dis.*, 8: 32-43, 2008.

PRINSKY, M. R. Pro- and anti-inflammatory balance in sepsis (Renal system). *Curr Opin Crit Care.* v. 6, p. 411-415, 2000.

RANGEL-FRAUSTO, M. S.; PITTET, D.; COSTIGAN, M. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. *The Journal of the American Medical Association.* v. 273, p.117-123, 1995.

RITTIRSCH, D.; HOESEL, L. M.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J. Leuk Biol.* v. 81, p. 137-143, 2007.

- RUSSELL, J. A. Management of Sepsis. *N Engl J Med.* v. 355, p. 1699-1713, 2006.
- SALES JUNIOR, J. A.; et al Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva.* v. 18, n. 1, 2006.
- SCHNAPER, W.; HAYASHIDA, T.; HUBCHAK, S. C.; PONCELET, A. C. TGF-signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* n. 284, p. 243-252, 2003.
- SCHRIER, R. W.; WANG, W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med.* n. 351, v. 2. p. 159-169, 2004.
- SCWAAB, S. J.; CHRISTENSEN, R. L.; DOUGHERTY, K.; KLAHR, S. Quantification of proteinuria by the use protein-to-creatinine ratios in single urine sample. *Arch Intern Med.* v.147, p. 934-940, 1987.
- SHAHID, M., FRANCIS, J., MAJID, D. S. A. Tumor necrosis factor- α induces renal vasoconstriction as well as natriuresis in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* n. 295, v.6: p. 1836-1844, 2008.
- SHERWOOD, E. R. Mechanisms of the inflammatory response. *Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.
- SILVA, E.; PEDRO, M. A.; SOGAYAR, A. C. B.; MOHOVIC, T.; SILVA, C. L. O.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R. G. R.; SOUSA, E. F.; ABE, T. P.; ANDRADE, J.; MATOS, J. D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P. C. S.; MATOS, G.F.J.; BENTO, A. M.; CORREA, A. D.; VIEIRA, P. C. B.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES Study). *Crit Care Med.* v. 8, p. R251-R260, 2004.
- SKIRO, J. P.; CHLEBNA-SOKOL, D.; KRZYANSKNA-OBERBEK, A. Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8); cytokines inhibitors (IL-6sR, sTNFRIII) and antiinflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in newborn and infants. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* v. 49, p. 399-404, 2001.
- SZABO, C. Role of nitric oxide in endotoxic shock. An overview of recent advances. *Ann N Y Acad Sci,* v. 30, p. 422-425, 1998.
- SZASZ, G. Reaction-Rate Method for g-Glutamyltransferase Activity in Serum. *Selected Methods of Clinical Chemistry.* vol. 8, p.47-53, 1977.
- TAISHI P.; CHURCHILL, L.; OBAL, F. JR.; KRUEGER, J. M. Cytokine mRNA induction by interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Brain Res* 1226: 89-98, 2008.
- TAKAHASHI, H; YASUHIRO, T; TAKEUCHI, D; KOBAYASHI, M;HERNDON, DN; SUZUKI, F: Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections. *Crit Care Med.* v. 32, n. 9, p. 1879-1885, 2004.
- THADHANI, R.; PASCUAL, M.; BONVENTRE, J. V. *Acute renal failure.* *N Engl J Med.* n. 334, v. 22, p. 1448-1460.
- THIJS, A.; THIJS, L. G. Pathogenesis of renal failure in sepsis. *Kidney International.* v. 53, n. 66, p. S34-S37, 1998.

UCHINO, S.; KELLUM, J. A.; BELLOMO, R.; DOIG, G. S.; MORIMATSU, H.; MORRGERA, S. Acute renal failure in critically ill patients – A multinational, multicenter study. *Journal of the American Medical Association*. n. 294, v. 7, p. 813-818, 2005.

VICENT, J. L. Update on sepsis: pathophysiology and treatment. *Acta Clin Belg*. n. 55, n. 2, p. 79-87, 2000.

VINCENT, J. L, BERNARD, G. R, BEALE, R. Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-label trial ENHANCE: Further evidence for survival and safety and implications for early treatment. *Crit Care Med*. ;33:2266-2277, 2005.

VINCENT, J.L.; SAKR, Y.; SPRUNG, C.L.; RANIERI, V.M.; REINHART, K.; GERLACH, H.; MORENO, R.; CARLET, J.; LE GALL, J.R.; PAYEN, D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.*, 34(2): 344-53, 2006.

WAIKAR, S .S; CURHAN, G. C.; WALD, R.; MCCARTHY, E. P.; CHERTOW, G. M. Declining mortality in patients with acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. n. 17, v. 4, p. 1143-1150, 2006.

WALLEY, K. R.; LUKACS, N. W.; STANDIFORD, T. J.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Balanced Of Inflammatory Cytokines Related To Severity And Mortality Of Murine Sepsis . *Infection And Immunity*. v. 64, p. 4733-4738, 1996.

WANG, H.; BLOOM, O.; ZHANG, M.; VISHNUBHAKAT, J. M.; OMBRELLINO, M.; CHE, J.; FRAZIER, A.; YANG, H.; IVANOVA, S.; BOROVIKOVA, L.; MANOGUE, K. R.; FAIST, E.; ABRAHAM, E.; ANDERSSON, J.; ANDERSON, U.; MOLINA, P. E.; ABUMRAD, N. N.; SAMA, A.; TRACEY, K. J. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. v. 285, p. 248-251, 1999.

WEIGAND, M. A.. The systemic inflammatory response syndrome. *Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol*. v. 18, n. 3, p. 455-475, 2004.

WENZEL, R. P. Treating sepsis. *N Engl J Med*. n.347; v.13; p.966-967, 2002.

WERLING, D.; JUNGI, T. W. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol*. n. 91, v. 1, p. 1-12, 2003.

WICHTERMANN, K. A; BAUE, A .E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. *Journal of Immunology*. v.146, p. 3478-3482, 1991.

ZANETTI, G.; HEUMANN, D.; GÉRAIN, J.; KOHLER, J.; ABBET, P.; BARRAS, C.; LUCAS, R.; GLAUSER, M. P.; BAUMGARTNER, J. D. Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. *J Immunol*. v. 148, p. 1890-1897, 1992.

ZHANG, H.; SLUTSKY, A. S.; VINCENT, J. L. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock. *Adv. Clin. Chem*. v. 33; p. 55-131, 2000.

ZHANG, Z. H.; WEI, S. G.; FRANCIS, J.; FELDER, R. B. Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF- α in rat: the role of central prostaglandins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R916–R927, 2003.

LAFERTY, H.M.; BRENNER, B.M. Are glomerular hypertension and hypertrophy independent risk factors for progression of renal disease? *Semin. Nephrol*. v. 10, p. 294-304, 1990.

GROND, J.; VAN GOOR, H.; ERKELENS, W.; ELEMA, J.D. Glomerular sclerosis in Wistar rats: analysis of its variable occurrence after unilateral nephrectomy. *Br. J. Exp. Pathol.* v.67, p.473-479, 1986b