

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**IMPORTÂNCIA DA REDUÇÃO DA MIGRAÇÃO DE
NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL
DE CAMUNDONGOS EM SEPSE INDUZIDA POR
*Staphylococcus aureus***

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em farmacologia

Aluna: Daniella Pereira Crosara
Alberto

Orientador: Prof. Dr. Fernando
de Queiróz Cunha

Ribeirão Preto – SP
2001

FICHA CATALOGRÁFICA

Crosara – Alberto, Daniella P.

Importância da redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos em sepse induzida por *Staphylococcus aureus*

Tese de Doutorado, apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Deptº de Farmacologia.

Orientador: Cunha, F.Q.

Dedico **especialmente** este trabalho,

Ao **Vitório** e à **Heloisa**, meus pais.

Ao **Fernando**, meu marido.

Ao **Gustavo** e à **Isabela**, meus filhos.

À **Flávia** e **Paula**, minhas irmãs.

Razões da minha vida....

Agradecimentos.

Ao meu orientador **Fernando de Queiroz Cunha** por ter me dado a oportunidade de formação profissional e acima de tudo pela confiança em mim depositada durante tantos anos de trabalho juntos (11 anos !!!!!).

Aos colegas **Cláudia, Cláudio, Pedro, Sandra, Fabrício, Nicolau** e tantos outros que me acompanharam e ajudaram na realização deste trabalho.

À **Sonia, Ramon e Fátima** pela ajuda sincera em várias oportunidades.

Ao **Acácio** e á **Vanessa** pela pronta assistência sempre prestada.

À **Ana Kátia dos Santos, Fabíola Leslie Mestriner, Diva Amábilé Montanha de Sousa, Giuliana Bertozi, Ieda Regina dos Santos e Sérgio Roberto Rosa**, todos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela ajuda técnica de que tanto valorizo.

À **Eliana**, bioterista do departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela manutenção dos animais de experimentação.

Ao **Roberto César Stahl e Jamilson Conceição Alves**, técnicos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental - UNICAMP, pela assistência técnica e colaboração.

À **Gilda**, pela revisão gramatical.

A todos que, de uma forma direta ou indireta, colaboraram e participaram, o meu muito obrigado.

Agradecimentos especiais:

Ao Dr. **Gilberto D'Assunção Fernandes**, professor do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, que colocou seu laboratório inteiramente a disposição para a realização deste trabalho.

Ao Dr. **Kleber Gomes Franchini**, professor doutor do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, pelas valiosas sugestões e postura crítica em vários momentos ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Igualmente, o Dr. **José Orivaldo Mengele Jr.**, professor doutor do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e amigo, proveu-me com o prazer de suas posições críticas, contribuindo para minha maturidade na compreensão do fenômeno biológico.

À Dra. **Margareth de Castro**, professora doutora do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e amiga, cujo apoio, em momento tão difícil no início do trabalho, viabilizou sua continuidade e conclusão.

À Dra. **Ana Lúcia Darini**, professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e amiga, que tanto colaborou com minha formação.

Ao **Jamilson Conceição Alves** pela amizade e assistência diária nesta longa e árdua jornada.

À **Rosana Inoue**, colega do laboratório do Dr. Kleber, pela amizade, ajuda e paciência.

Aos meus amigos e exemplos de vida, **Dr. Sérgio Henrique Ferreira** e **Dra. Clotilde Rosseti Ferreira**, que há tanto convivo e admiro. Experiências que serão para o resto de minha vida.

A todos, minha mais sincera amizade e reconhecimento.

RESUMO	1
1 – INTRODUÇÃO	
1.1 – Epidemiologia	3
1.2 – Definições e fisiopatologia da sepse.....	3
1.3 – <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.4 – <i>Staphylococcus aureus</i> e sepse	6
1.4.1 - Componentes da parede celular	6
1.4.2 - Produtos solúveis	7
1.4.2.1 - Toxinas superantigênicas	7
1.4.2.2 - Hemolisinas e toxinas formadoras de poros.....	9
1.5 – Mediadores inflamatórios e sepse.....	10
1.5.1 - Participação das citocinas.....	10
1.5.2 - Participação do Óxido Nítrico	13
1.6 – Migração neutrofílica e sepse	14
1.6.1 - Alterações no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório	16
2 – OBJETIVOS	19
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 – Animais experimentais	20
3.2 - Obtenção das bactérias	20
3.3 – Modelo experimental de sepse.....	20
3.4 – Quantificação das colônias de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.5 – Leucograma.....	21
3.6 – Histologia dos órgãos.	21
3.7 – Monitorização da pressão arterial.....	22
3.8 – Migração de neutrófilos	22
3.8.1 – Contagem total.....	22
3.8.2 – Contagem diferencial	22
3.8.3 – Migração <i>in vitro</i> de neutrófilos	23
3.9 – Alterações das populações celulares.....	23
3.9.1 – Aumento da população de macrófagos da cavidade peritoneal	23

3.9.2 – Redução da população de mastócitos.....	24
3.10 – Agentes farmacológicos que interferem com o óxido nítrico	24
3.11 - Dosagem de TNF- α , IL-1 β e IL-10.....	25
3.11.1 – TNF- α e IL-1 β	25
3.11.2 – IL-10.....	26
3.12 - Análise estatística	27
3.13 – Soluções.....	27
3.14 - Drogas e reagentes	29
3.15 - Citocinas e anticorpos.....	29
4 – RESULTADOS	
4.1 – Padronização do modelo experimental de sepse.....	30
4.1.1 – Sobrevida e migração de neutrófilos.....	30
4.1.2 – Cinética da migração de neutrófilos e da quantidade de bactérias no exsudado e sangue.....	32
4.1.3 - Leucograma	32
4.1.4 – Histologia dos órgãos.....	35
4.1.5 - Pressão arterial	35
4.1.6 – Quantificação de citocinas.....	38
4.2 – Envolvimento de mediadores na redução da migração de neutrófilos.....	40
4.2.1 - Participação do TNF- α	40
4.2.2 - Participação do IFN- γ	42
4.2.3 - Participação do óxido nítrico	44
4.2.3.1 - Efeito da administração de aminoguanidina.....	44
4.2.3.2 - Análise dos diferentes parâmetros 12 h após o pré- tratamento com aminoguanidina	47
4.2.3.3 - Efeito de diferentes tratamentos de aminoguanidina sobre a inoculação subletal.....	49
4.2.3.4 - Efeito de N- ω -nitro-L-arginine	49
4.2.3.5 - Animais deficientes da enzima NOSi	52
4.2.3.6 - Efeito da D-Penicilamina	52

4.2.3.7 - Óxido nítrico e migração <i>in vitro</i> de neutrófilos.....	55
4.3 - Participação de células residentes na redução de migração de neutrófilos.....	57
4.3.1 - Efeito do aumento do número do número de macrófagos.....	57
4.3.2 - Efeito da depleção de mastócitos	59
4.3.2.1 - Pré-tratamento com água destilada.....	59
4.3.2.2 – Efeito do pré-tratamento com composto 48/80.....	59
5 – DISCUSSÃO	62
6- CONCLUSÕES FINAIS.....	75
7 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
SUMMARY.....	89

Resumo

Foi demonstrado anteriormente nos modelos de endotoxemia e de ligadura e perfuração de ceco (CLP) que a redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal está correlacionada com o pior prognóstico da doença. Assim, objetivamos no presente estudo: **a** – Padronizar o modelo de sepse induzido por *S.aureus*; **b** - Caracterizar o fenômeno da redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso; **c** - correlacionar o maior ou menor recrutamento dos neutrófilos na cavidade peritoneal, com o número de bactérias nesta cavidade e no sangue; **d** - investigar a participação de citocinas como TNF- α e IFN- γ na redução da migração de neutrófilos; **e** - analisar o possível papel do NO na redução da migração de neutrófilos; **f** - identificar o tipo de célula residente, como fonte de mediadores envolvidos na redução da migração de neutrófilos.

Dois grupos experimentais foram estabelecidos: o grupo subletal (SL) ($0,5 \times 10^9$ UFC/cavidade) apresentou 100% de sobrevivência, migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (12×10^6 neutrófilos/cavidade) e pequena quantidade de bactérias no exsudado peritoneal e ausência de bacteremia. Por outro lado, o grupo que recebeu inóculo letal (L) (16×10^9 UFC/cavidade) apresentou 100% de mortalidade, além de redução da migração dos neutrófilos para cavidade peritoneal (4×10^6 neutrófilos/cavidade), grande presença de bactérias na exsudato peritoneal e acentuada bacteremia. Ainda neste grupo, foi observado edema agudo de pulmão e infiltrado de PMN neste órgão. Ambos os grupos experimentais apresentaram níveis elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-10, tanto no soro, quanto no exsudato, caracterizando dessa forma o modelo de sepse utilizado no presente estudo.

Objetivando estudar a participação de TNF- α e IFN- γ no fenômeno da falência da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, foram utilizados animais deficientes para o receptor p55 de TNF- α e animais deficientes para a produção de IFN- γ . Ambos os grupos, selvagens e deficientes, que receberam inóculo letal apresentaram resultados semelhantes quanto à falência da migração, sobrevivência e quantidade de bactérias no exsudato peritoneal. Entretanto, os animais deficientes que receberam inóculo subletal apresentaram maior número de bactérias na cavidade e maior letalidade do que os selvagens, apesar do número de neutrófilos no foco infeccioso ser semelhante. Desta maneira, sugerimos que a redução da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal não é mediada pelo TNF- α ou IFN- γ , embora sugerimos a participação destas citocinas na atividade bactericida dos neutrófilos.

O envolvimento do óxido nítrico (NO) no presente modelo foi estudado a partir da administração de aminoguanidina. O pré-tratamento com esta droga seguido da administração da inóculo letal previniu a redução da migração de neutrófilos, reduziu a quantidade de bactérias no exsudato peritoneal e sangue, embora a taxa de sobrevivência foi a mesma nos animais pré-tratados ou apenas inoculados. A administração de uma dose de 5 mg/kg de aminoguanidina, 6 horas após a inoculação letal, apresentou sobrevivência de 40%, acompanhada da prevenção da migração dos neutrófilos e diminuição do número de bactérias no exsudato peritoneal. O conjunto destes dados demonstram que o NO participa da redução da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal e que esta redução está correlacionada com o pior prognóstico da doença.

Corroborando com os dados de que o NO está envolvido na falência da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, estudo da migração *in vitro* de neutrófilos revelaram que neutrófilos provenientes de animais que receberam inóculo letal possuíam menor capacidade quimiotática. Além disto, o pré-tratamento com aminoguanidina restabeleceu esta capacidade.

Caracterizando a importante atividade microbicida do NO no presente modelo, o grupo subletal tratado com aminoguanidina (30 minutos antes da inoculação e 2 horas após), apresentou maior quantidade de bactérias presentes no exsudato peritoneal e bacteremia, apesar de manter o número de neutrófilos na cavidade semelhante aos animais não tratados. Além disto, a sobrevida dos animais tratados é 50% menor. Dados que corroboram com os anteriormente citados, foram obtidos de animais deficientes para a enzima NOSi. Os animais deficientes que receberam inóculo subletal apresentaram maior quantidade de bactéria na cavidade peritoneal, assim como uma menor taxa de sobrevida do que os animais selvagens que receberam a mesma inoculação. Estes dados analisados em conjunto demonstram a importância do NO como agente bactericida do *S.aureus*.

No que se refere à participação de outros tipos celulares como fonte de mediadores envolvidos na redução da migração de neutrófilos para o sítio infeccioso, observamos que tanto o aumento do número de macrófagos, quanto a diminuição dos mastócitos residentes na cavidade peritoneal, preveniram a redução da migração de neutrófilos, diminuíram a quantidade de bactérias presentes no exsudato peritoneal e sangue. Nestes animais a taxa de sobrevida foi de 100%. Assim o aumento do número de macrófagos residentes melhora o prognóstico da doença, entretanto os mastócitos parecem ser a fonte de mediadores envolvidos na redução da migração de neutrófilos no presente modelo de sepse.

1 - Introdução

1.1 - Epidemiologia

Atualmente, não há dados exatos sobre a incidência de sepse, mas sabidamente, esta síndrome atinge, aproximadamente, 500.000 pessoas por ano nos Estados Unidos. Número que vem crescendo devido a várias razões, entre elas: aumento da idade populacional; crescente aumento de agentes imunossupressores; melhora do prognóstico de doenças previamente fatais; uso de procedimentos médicos diagnósticos e terapêuticos mais agressivos e aparecimento de patógenos mais resistentes a antibióticos. Todos estes fatores citados contribuem para que a mortalidade de pacientes com sepse varie de 20 a 50% (Sands et al., 1997), com impacto econômico em hospitais americanos, em torno de 25 bilhões de dólares anuais (Stewart & Zhang, 1999). Considerando então a questão humana e custos financeiros, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para diagnóstico precoce da sepse, assim como o melhor entendimento da mediação envolvida, o que levaria a estratégias mais eficazes de tratamento.

No quadro séptico podem ser observados três processos distintos, porém intimamente interligados: o foco infeccioso, as alterações hemodinâmicas e o processo inflamatório. Atualmente o tratamento da sepse se concentra em combater o agente infeccioso com antibióticos e a utilização de drogas que atuam nas alterações hemodinâmicas decorrentes do quadro séptico, pouco se interferindo no processo inflamatório. Portanto, decorrente do melhor entendimento da relação entre agente infeccioso e a resposta inflamatória local e sistêmica, pode-se vislumbrar nova frente para intervenção terapêutica (Quezado et al., 1995).

1.2 - Definições e fisiopatologia da sepse.

O termo sepse é definido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) decorrente de infecção por bactérias, fungos, helmintos e vírus. A denominação SIRS foi criada para incluir tanto a sepse, quanto doenças semelhantes provenientes de causa não infecciosa, como trauma, isquemia, queimadura, pancreatite e hemorragia. Clinicamente SIRS é identificada, quando o paciente apresenta duas ou mais das seguintes condições (Bone et al., 1997):

- hipertermia (temperatura maior que 38° C)
- hipotermia (temperatura menor que 36° C)

- taquicardia (frequência cardíaca maior que 100 batimentos/ minuto)
- taquipnéia (frequência respiratória maior que 20 respirações/ minuto ou PCO_2 menor que 20 mmHg)
- contagem de células totais sanguínea maior que $12000/mm^3$ ou menor que $4000/mm^3$ ou mais de 10% de formas imaturas circulantes no sangue periférico.

Como consequência da sepse temos a Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO), que acomete 30% dos pacientes com sepse, enquanto que quase todos desenvolvem disfunção de um órgão (Davies & Hagen, 1997). O choque séptico é o agravamento da sepse, caracterizado por acentuadas alterações hemodinâmicas, são elas: hipotensão (pressão arterial média (PAM) $< 90\text{mmHg}$ ou redução de PAM basal em 40mmHg) não responsiva à reposição de líquidos ou a agentes vasoconstritores; perfusão anormal de órgãos e tecidos decorrentes da vasodilatação e vasoconstrição inadequadas de pequenos vasos; diminuição da resistência vascular sistêmica e aumento da frequência cardíaca (100 batimentos cardíacos ou mais) (Crowley, 1996).

O choque séptico se desenvolve quando componentes microbianos específicos entram na circulação e são reconhecidos pelo sistema de defesa, causando liberação exagerada de mediadores inflamatórios (Lynn & Cohen, 1995). Componentes da parede celular como lipopolissacarídeo (LPS) em bactérias Gram-negativas e peptidoglicano e ácido lipoteicóico em bactérias Gram-positivas ou ainda proteínas liberadas durante o crescimento de bactérias Gram-positivas (enterotoxinas) são os principais componentes microbianos que induzem reação inflamatória intravascular que culminam no choque séptico.

Há duas décadas a porcentagem de incidência de sepse induzida por bactérias Gram-negativas era maior do que aquelas provocadas por bactérias Gram-positivas. Por consequência, dados obtidos até hoje sobre sepse são decorrentes de modelos experimentais com bactérias Gram-negativas e/ou LPS (lipopolissacarídeo). Assume-se, atualmente, que a patogênese da sepse induzida por bactérias Gram-positivas seja igual àquelas induzidas por Gram-negativas (Opal & Cohen, 1999; Sriskandan & Cohen, 1999). Além disto a mortalidade dos pacientes em choque séptico causado por bactérias Gram-positivas tem sido a mesma ou excedido a porcentagem de morte de pacientes em choque causado por Gram-negativas (Friedman, et al., 1998; Cohen, 2000; Tarkowski, 2000).

As bactérias Gram-positivas que apresentam maior patogenicidade são: *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Torna-se então evidente a necessidade de se estudar os mecanismos envolvidos na sepse induzida por bactérias Gram-positivas. No presente trabalho optamos em estudar o modelo experimental de sepse induzido por *Staphylococcus aureus*, administrados vivos, por via intraperitoneal.

1.3 – *Staphylococcus aureus*

Membros do gênero Staphylococci são cocos Gram-positivos (diâmetro varia de 0,5 a 1,5 μm), não formadores de esporos, ocorrem individualmente, ou em pares, ou tétrades ou em pequenas cadeias. Este gênero é composto de 332 espécies e 15 subespécies. O principal representante, o mais estudado e o mais patogênico é o *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus (do grego: *staphylé*: cacho; *kókekus*: de forma arredondada; do latim *aurum*: cor de ouro) são bactérias que se apresentam em aglomerados semelhantes a cachos de uva, apresentando colônias amareladas. São amplamente distribuídos na natureza, entretanto encontram-se principalmente na pele e mucosas de mamíferos e aves, mas podem aparecer com menor frequência na boca, glândulas mamárias, sangue e nos tratos genitourinário, gastrointestinal e respiratório.

Geralmente, esta bactéria apresenta relação benigna ou simbiótica com o hospedeiro, entretanto, se a pele (barreira natural) for lesada por trauma, ou se houver inoculação por agulhas ou implantação direta de corpos estranhos (catéteres, válvulas cardíacas, próteses ósseas, entre outros), estes organismos atingirão diferentes tecidos dos hospedeiros, colonizando-os, desenvolvendo a partir daí características patogênicas. Infecção hospitalar causada por *S.aureus* é a maior causa de morte relatada atualmente. A infecção por este tipo bacteriano é aguda e pirogênica, e se não for tratada rapidamente, pode ser disseminada pela corrente sanguínea e afetar outros órgãos distantes do foco primário da infecção. As infecções mais severas provocadas por *S.aureus* são bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite aguda, pericardite, meningite e abscessos no trato urogenital, sistema nervoso central, e diversos órgãos intra-abdominais (Murray et al., 1999).

1.4 – *S. aureus* e sepse

A resposta inicial de defesa do organismo contra um dano tissular, iniciado por trauma mecânico ou químico ou ainda pela invasão de microorganismo, resulta em um processo complexo, rápido e altamente controlado por respostas celulares e humorais, tendo como consequência a ativação de sistemas como o complemento, fibrinolítico e das cininas e a cascata de coagulação. Como consequência da ativação dos sistemas acima citados, temos a liberação de mediadores inflamatórios de grande diversidade e importância. Este processo é considerado benigno, se a resposta inflamatória for regulada adequadamente, para manter células e mediadores inflamatórios somente no local da injúria tissular.

As citocinas são mediadores inflamatórios endógenos que desempenham papel importante, na iniciação da sepse. A produção das citocinas é ativada por bactérias e seus produtos, além de fungos, vírus ou parasitas. Interleucinas, assim como quimiocinas, participam ativamente da patogênese da sepse, apresentando diferentes papéis biológicos, dependendo do modelo experimental utilizado. Devido à grande importância das citocinas na patogênese da sepse, será apresentado um item sobre este tópico, posteriormente (item I . 5 – Mediadores inflamatórios e sepse).

Por outro lado, a presença de mediadores inflamatórios ou mesmo de bactérias e/ou seus produtos na corrente sanguínea, ocorrerá ativação de células endoteliais dos vasos sanguíneos e dos leucócitos, que por sua vez vão também liberar fatores pró-inflamatórios, caracterizando um processo sistêmico. Este quadro é responsável pela maioria das alterações fisiopatológicas observadas na sepse, assim como em modelos experimentais utilizados para se estudar esta síndrome.

A habilidade do *S.aureus*, em modular a resposta imune do hospedeiro, resulta da ação de múltiplos fatores determinantes de sua virulência, que são expressos com diferentes combinações. Estes fatores determinantes da virulência incluem proteínas da parede celular, hemolisinas, superantígenos e toxinas formadoras de poros que agem através da ativação de diferentes mecanismos.

1.4.1 - Componentes da parede celular

Dois componentes da parede celular do *S.aureus* são liberados após sua lise e são capazes de induzir processo inflamatório, são eles: peptidoglicano G e ácido lipoteicoico. Heumann et al., 1994, demonstraram que estes componentes da parede

celular de bactérias Gram-positivas estimulam a síntese de Fator de Necrose Tumoral (TNF, do inglês *Tumour Necrosis Factor*) e interleucina (IL) – 6 por monócitos humanos. Além disto, quando se administrou peptidoglicano endovenosamente em cobaias, observou-se leucopenia, trombocitopenia e ativação do sistema complemento, sugerindo que o peptidoglicano desempenha papel importante no desenvolvimento da sepse (Spika et al., 1982). No modelo experimental desta doença em ratos anestesiados, através da administração intravenosa de peptidoglicano ou ácido lipoteicóico, demonstrou-se que tanto ácido lipoteicóico quanto peptidoglicano agem sinergicamente no aumento dos níveis plasmáticos de TNF, na ativação da enzima sintase do óxido nítrico induzida (NOSi) presente na aorta, rins e fígado e aumento de nitrito e nitrato no soro, quadro que culmina em choque e falência de múltiplos órgãos (Kengatharan et al., 1996).

Compostos com propriedades anti-endotoxina são atualmente estudados devido ao seu potencial terapêutico na sepse induzida por bactérias Gram-negativas. Estudos semelhantes têm sido realizados com bactérias Gram-positivas. Scott et al., 1999, estudaram a capacidade de peptídeos catiônicos de interagirem com ácido lipoteicóico e demonstraram que estes peptídeos inibem a produção de TNF e IL-6 por uma linhagem macrofágica de camundongos, bem como a produção de TNF por leucócitos humanos. Assim, estes peptídeos catiônicos podem ser ferramentas importantes para o desenvolvimento de novas terapias no tratamento desta síndrome e inflamação causadas por bactérias Gram-positivas ou ainda auxiliem no melhor entendimento desta síndrome.

1.4.2 – Produtos solúveis

1.4.2.1 – Toxinas superantigênicas

Além dos componentes da parede celular de bactérias Gram-positivas acima discutidas, estas bactérias produzem toxinas (também denominadas de enterotoxinas) liberadas durante o seu crescimento, que são caracterizadas como superantígenos.

Proteínas estranhas ao organismo são primeiramente internalizadas por células apresentadoras de antígenos (células APC – do inglês *Antigen Presenting Cells*) tais como macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e são processados em

compartimentos vesiculares. A apresentação destes antígenos ocorre através da ligação do peptídeo antigênico ao MHC de classe II (do inglês – *Major Histocompatibility Complex*) formando complexos imunogênicos. Estes complexos são apresentados na superfície de células APCs, que são reconhecidos por células T.

Diferente do que acontece com os antígenos, os superantígenos se ligam diretamente às moléculas de classe II da APC, fora do sítio de interação com o antígeno sem necessidade de serem reconhecidas e processadas pelas APCs. O reconhecimento do complexo MHC-superantígeno ocorre através dos clones de linfócitos T expressando cadeias V β em seu TCR. Os superantígenos apresentam grande capacidade de ativar células T, induzindo liberação de quantidades maciças de citocinas, principalmente TNF- α , fato responsável pelos sintomas associados ao choque séptico como hipotensão e febre.

Os superantígenos liberados por *Staphylococcus aureus* são classificados como enterotoxinas (SE – do inglês *Staphylococcal Enterotoxin*) dos tipos A (SEA), B (SEB), C (SEC) (subdivididas em C1, C2 e C3), D (SED), E (SEE), H (SEH), G (SEG), I (SEI) e TSST-1 (*Toxic Shock Syndrome Toxin 1*). Como exemplo da participação dos superantígenos em algumas doenças temos: envenenamento por alimentos, erisipela, febre reumática, psoríase, artrite, dermatite atópica e choque séptico (Bannan et al., 1999; Mundson et al., 1998).

No caso de choque séptico foi demonstrado que a administração de SEB ou TSST-1 em camundongos injetados previamente com D-Galactosamina (droga que provoca lesão às células hepáticas, proporcionando maior sensibilidade dos animais às substâncias indutoras da sepse) mimetizam os efeitos deletérios do choque séptico através da ativação de células T com conseqüente produção de TNF e IL-2, ocasionando morte dos animais (Miethke et al., 1992; Miethke et al., 1993). Mais recentemente tem-se sugerido que além do SEB, a enterotoxina A é igualmente importante na patogênese da sepse. De Boer et al., 1999, demonstraram que cepas de *S.aureus*, capazes de liberar SEA e TSST-1 simultaneamente, quando administradas em animais pré-injetados com galactosamina são mais letais do que aquelas que liberam somente TSST-1. A maior letalidade pode ser devido a um efeito aditivo ou sinérgico na indução da proliferação de células T e produção de citocinas.

Em conclusão, dados de literatura demonstram que peptídeos da parede celular de bactérias Gram-positivas (peptidoglicano e ácido lipoteicóico) e as diferentes

enterotoxinas liberadas pelo *S.aureus* são todos fatores responsáveis pela patogênese da sepse.

1.4.2.2 - Hemolisinas e toxinas formadoras de poros

Toxinas formadoras de poros são produzidas e secretadas por bactérias na forma de proteínas solúveis em água. Elas se ligam via receptor específico expresso na membrana de diferentes tipos celulares ou de maneira inespecífica a camadas celulares lipídicas. Após a adesão, as proteínas se inserem na membrana celular formando poros transmembranares. A formação do poro é freqüentemente precedida da oligomerização das moléculas de toxinas, que irão formar poros maiores, os quais podem ser visualizados por microscopia eletrônica. Dependendo da extensão do poro na membrana celular, ele pode ser permissivo a somente um íon ou até a proteínas citoplasmáticas (Sriskandan & Cohen, 1999).

O *Staphylococcus aureus* é capaz de liberar grande variedade deste tipo de produto bacteriano. Como exemplos temos: α -, β -, δ -, γ - hemolisinas e leucocidina. A α -toxina é a mais bem estudada deste grupo. Ela se liga a proteínas inespecíficas da membrana de células alvo, formando poros de aproximadamente 1nm. As células mais susceptíveis à toxina são plaquetas, monócitos, linfócitos e principalmente células endoteliais. Como consequência da formação de poros temos a produção de radicais livres que contribuirão para a injúria tecidual e liberação de mediadores lipídicos como prostaglandinas que irão contribuir para a vasodilatação e consequente hipotensão observada no sepse (Sriskandan & Cohen, 1999).

Como exemplo da capacidade de toxinas bacterianas em induzir resposta inflamatória podemos citar os achados publicados por Nilsson et al., 1999. No modelo experimental de artrite séptica induzida por *S.aureus*, estes autores demonstraram que bactérias que produzem α - e γ - toxina induziam processo inflamatório de maior intensidade e porcentagem da ocorrência de artrite com lesão tecidual e perda de peso corporal maiores do que aquelas linhagens bacterianas que produzem somente uma, ou nenhum tipo de toxina.

1.5 – Mediadores inflamatórios e sepse

1.5.1 – Participação das citocinas.

Citocinas são peptídeos liberados após um determinado estímulo por leucócitos e posteriormente, por células recrutadas para o foco infeccioso. Estas citocinas desempenham papel fundamental na resposta do hospedeiro frente à infecção. Citocinas como interleucinas (IL)-1, IL-8 e TNF e os demais fatores quimiotáticos para leucócitos, as quimiocinas, recrutam células para o sítio de infecção, ativando-os. Como consequência estas células se tornam mais eficientes em resolver a infecção mais rapidamente, sendo fundamental para o controle local. A evolução da infecção localizada até a resposta inflamatória sistêmica se dá pela presença de citocinas na circulação podendo haver também a presença de bactérias, ou seus produtos. A presença destas substâncias na corrente sanguínea leva à ativação de células endoteliais nos diferentes tecidos e de leucócitos no sangue, que por sua vez vão também liberar fatores pró-inflamatórios, e é este quadro responsável pela maioria das alterações fisiopatológicas observadas durante um quadro de sepse em humanos e em modelos experimentais (Davies & Hagen, 1997).

Uma complexa rede que consiste na interação entre diferentes citocinas e possivelmente outros fatores liberados pelo sistema imune é observada no decorrer desta doença.

Classicamente, o TNF- α foi descrito como mediador central no desenvolvimento da sepse devido a algumas evidências: *a* - a injeção de TNF em animais experimentais causa colapso hemodinâmico, injúria em diversos órgãos vitais e coagulação intravascular disseminada, mimetizando os principais eventos observados durante o choque séptico (Tracey et al. 1986), *b* - a administração de anticorpo anti-TNF- α diminui a taxa de mortalidade de animais que apresentam bacteremia (Tracey et al., 1987). Em modelo de choque séptico induzido pela infusão de *S.aureus*, o pré-tratamento destes animais com anticorpo anti-TNF preveniu a disfunção de múltiplos órgãos e impediu a morte destes animais. (Hinshaw et al., 1992), reforçando a idéia da importância do TNF no desenvolvimento da sepse. Entretanto os estudos mais recentes, os quais utilizaram novos modelos e ferramentas experimentais, vêm sugerindo outras atribuições ao TNF- α . Mazolewski et al., 1999, demonstraram que o bloqueio da liberação de TNF- α com inibidores de metaloproteinase em modelo de infusão de *E.coli*

viva não afetou o curso da doença. Corroborando com este dado, na peritonite induzida em ratos, o tratamento com anticorpo anti-TNF não alterou a sobrevivência dos animais (Bagby et al., 1991). Assim podemos dizer que a relevância desta citocina na sepse difere entre os modelos experimentais utilizados.

A IL-1 também desempenha importante papel na sepse, pois foi correlacionado o nível desta citocina no plasma de pacientes com a gravidade dessa doença (Waage et al., 1989). Além disto, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) reduziu a letalidade no modelo de choque séptico induzido por endotoxina (Ohlsson, 1990). Finalmente com desenvolvimento de animais deficientes para enzima conversora de IL-1, incapazes de produzirem a forma ativa de IL-1 β (mas apenas pequenas quantidades de IL-1 α) demonstrou-se menor letalidade destes animais após a administração de endotoxina (Li et al., 1995). É importante lembrar que existe sinergismo entre IL-1 e TNF- α , os quais estimulam a liberação de IL-8 e IL-6, amplificando desta maneira a resposta (Dinarello, 1997).

Outra citocina que apresenta efeitos pró-inflamatórios é o interferon gamma (IFN)- γ . Dentre seus efeitos podemos citar: aumento do número de receptores de superfície para TNF em macrófagos, tornando-os mais sensíveis; age em sinergia e participa de muitos dos efeitos do TNF; aumento da expressão de moléculas de adesão, entre outras (Crowley, 1996). Na sepse a importância desta citocina foi demonstrada utilizando-se o modelo hematogênico com *S.aureus*. Para tanto, se utilizou animal deficiente do receptor de IFN- γ ou a administração de anticorpo anti-IFN- γ e foi observada a proteção do animal quanto a morte além da queda dos níveis de bactérias no sangue (Zhao & Tarkowisk, 1995; Zhao et al., 1998).

Paralelamente à liberação de citocinas pró-inflamatórias, o organismo responde a agentes infecciosos, liberando citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-13, TGF- β , antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra - do inglês *IL-1 receptor antagonist*), além de receptores solúveis para IL-1 (IL-1R tipo II), TNF- α , IL-6 e outros. Esses mediadores são encontrados tanto no soro, quanto no exsudato de pacientes em sepse ou em modelos experimentais e, parecem contrabalançar as ações dos mediadores pró-inflamatórios, através da redução da síntese e da liberação desses mediadores ou antagonizar seus efeitos (Dinarello, 1997). Van der Poll et al., 1997, demonstraram em experimentos clínicos que pacientes com sepse apresentavam níveis plasmáticos mais

elevados de IL-10 e IL-1R tipo II em comparação com pessoas saudáveis. Além disso o nível de IL-10 pode estar relacionado com a gravidade do caso, visto que as concentrações de IL-10 no plasma dos pacientes que morreram ao longo do estudo se mantiveram altas em relação aos pacientes que sobreviveram, nos quais as concentrações de IL-10 se reduziram após 3 dias. No modelo experimental de sepse induzida por SEB em camundongos, demonstrou-se o papel protetor da IL-10, que é liberada por células CD4⁺ e atuam como reguladora da liberação de IL-2 e IFN- γ (Florquin et al., 1994a). Atualmente utiliza-se a transferência de vetores de adenovírus com o gene da IL-10, capazes de produzir IL-10 para se demonstrar o envolvimento desta citocina no modelo de sepse induzida por *E.coli*. Assim os animais que receberam o vetor 3 horas antes ou uma hora após as bactérias, apresentavam menor quantidade de TNF- α no soro além de apresentarem menor mortalidade (Takakuwa et al., 2000). Demonstrando assim o importante papel da IL-10 na sepse, provavelmente atuando como regulador da produção do TNF- α .

Outra família de citocinas que estão envolvidas na sepse é a das quimiocinas. Estas são citocinas de baixo peso moleculares, envolvidas principalmente no recrutamento de leucócitos até o sítio inflamatório. A IL-8 pertence a subfamília α das quimiocinas e é um potente agente quimiotático e ativador de neutrófilos, capaz de aumentar a resposta inflamatória pela indução da liberação de radicais livres e enzimas proteolíticas. Estudos com pacientes que apresentavam sepse demonstraram que os níveis plasmáticos de IL-8 estão aumentados e se correlacionam com importantes parâmetros clínicos, bioquímicos e inflamatórios observados no choque (Hack et al., 1992). Dados obtidos de literatura com pacientes em choque sugeriram que maiores níveis de IL-8, IL-6 e receptores solúveis de IL-2 identificados, no soro, são fortes indicadores de que estes pacientes desenvolverão lesão de múltiplos órgãos (Takala et al., 1999). Foi demonstrado que a IL-8 é um dos primeiros mediadores que são liberados por células monocíticas humanas em resposta direta ao estímulo com TSST-1, SEA e SEB (enterotoxinas de *S.aureus*) (Krakauer, 1998) ou ainda ácido lipoteicoico (Standiford et al., 1994). Assim a IL-8 é um sinal proinflamatório no recrutamento de neutrófilos para os tecidos e deve contribuir para a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos, característica principal do choque séptico induzido por bactérias Gram-positivas, sugerindo importante papel no desenvolvimento do quadro séptico em humanos.

1.5.2 – Participação do óxido nítrico

O acúmulo de leucócitos no foco infeccioso e sua ativação pelos mediadores anteriormente mencionados induz à formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio como anion superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO), respectivamente. Além de seus efeitos próprios, esses radicais também podem reagir entre si produzindo o peroxinitrito (ONOO⁻), potente agente oxidante (Hampton, 1998). O NO é formado a partir da oxidação do nitrogênio terminal do aminoácido L-arginina pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS - do inglês: *Nitric Oxide Synthase*). Existem pelo menos três isoformas desta enzima: 1 – NOS neural (NOSn ou NOS I); 2 – NOS induzida (NOSi ou NOS II) e 3 – NOS endotelial (NOSe ou NOSIII) (Knowles & Moncada, 1994).

A presença de NO e seus metabólitos têm sido detectada em diferentes modelos experimentais de sepse. Acredita-se que o NO produzido pela NOS induzida é amplamente responsável por muitas das seqüelas da sepse, incluindo vasodilatação, depressão miocárdica, resistência vasopressora periférica, entre outras. Esta enzima é induzida por citocinas como TNF, IL-1 β , IFN- α , β e γ , liberadas durante o processo inflamatório, infeccioso (Wolkow, 1998) ou durante a endotoxemia (Cunha et al, 1994). A origem do NO no processo infeccioso não é clara, entretanto sugere que provenha das células endoteliais, neutrófilos e macrófagos (Moncada & Higgs, 1993).

Muitos trabalhos têm demonstrado que o NO modula a resposta inflamatória, atuando como substância pró-inflamatória. Na pleurisia induzida por carragenina em ratos, a administração de L-NMMA (substância análoga a L-arginina e inibidor não seletivo da NOS) atenuou a exsudação pleural (Tracey et al., 1995). O papel da NOSi na resposta pró-inflamatória foi demonstrado em camundongos deficientes dessa enzima, nos quais: 1- carragenina promoveu menor edema de pata em relação aos animais normais; 2- em modelo experimental de sepse causada pela administração intraperitoneal de LPS, estes animais deficientes da NOSi são mais resistentes aos efeitos letais da doença. Estes dados apontam para o NO, produzido pela NOSi, como um importante mediador com efeitos pró-inflamatórios (Wei et al., 1995). Outro efeito importante do NO proveniente da NOSi é a hipotensão provocada pela administração de LPS a animais ou a pacientes em choque séptico (Wolkow, 1998).

Apesar dos dados demonstrando o papel pró-inflamatório para o NO, existem evidências de que esse mediador também apresenta ação antiinflamatória. Na peritonite induzida por SEB em camundongos, o inibidor da NOS, *N-nitro-L-arginine methyl ester* (L-

NMMA) aumentou a mortalidade dos animais, sugerindo um efeito benéfico do NO liberado endogenamente, através da regulação negativa de TNF- α e IFN- γ (Florquin et al., 1994b). Além disto, o tratamento com *N-omega-nitro-L-arginine-methyl-ester* (L-NAME), outro inibidor da NOS, aumentou a mortalidade induzida pela administração i.p. de *E.coli* vivas em camundongos, assim como a quantidade de bactérias na cavidade peritoneal, concomitante ao aumento de níveis plasmáticos de TNF - α (Fukatsu et al., 1995).

De maneira geral, podemos concluir que o NO e outros mediadores endógenos acima citados devem agir de forma seqüencial e/ou antagônicas na tentativa de se manter o equilíbrio para a resposta adequada do organismo contra a infecção. A exacerbação ou a falta na produção destes mediadores agrava ainda mais o quadro de sepse.

Além dos diversos efeitos do NO acima citados, ele desempenha um importante papel de defesa do hospedeiro, através de seu efeito microbicida. O NO faz parte do arsenal utilizado pelos leucócitos para suas atividade microbicidas, pois é extremamente reativo e forma complexos como hemeproteínas, formando produtos como nitrosotiol e ONOO- (Hampton et al., 1998). Macrófagos ativados com IFN- γ apresentam atividade microbicida intracelular, por mecanismos dependentes da síntese de NO, como demonstrado na infecção por *Trypanossoma cruzi* (Silva et al., 1995). Foi ainda demonstrado em experimentos *in vitro* que o efeito microbicida dos neutrófilos contra *Candida albicans* e bactérias acontece, pelo menos em parte, pela liberação de NO (Fierro et al., 1996; Fierro et al., 1999).

1.6 - Migração neutrofilica e sepse

A ativação e a saída dos leucócitos do vaso é resultado de um processo complexo que envolve fases múltiplas e seqüenciais. A fase inicial no processo de migração celular é o rolamento do leucócito ao longo da parede do vaso. Este processo inicial é mediado por uma família das moléculas de adesão: as selectinas. Esta família possui 3 sub-famílias distintas. L-selectinas são expressas pelos leucócitos, enquanto que as P- e E - selectinas são expressas pelas células endoteliais ativadas. P-selectinas são mobilizadas dos estoques intracelulares por mediadores como histamina e trombina, enquanto que E-selectinas requerem síntese protéica *de novo* induzida por LPS , IL-1 e

TNF- α . Subseqüente ao rolamento ocorre adesão firme entre leucócito e endotélio estabelecido pela ligação das integrinas expressas nos leucócitos a membros da superfamília das imunoglobulinas expressas pelo endotélio. Está bem estabelecido que CD11a/CD18, CD11b/CD18 (membros da família das β 2-integrinas) e VLA-4, do inglês *very late antigen*, (membro da família das β 1-integrinas) são essenciais no processo de recrutamento celular. CD11a/CD18 e CD11b/CD18 ligam-se a ICAM -1 (do inglês *intercellular adhesion molecule*) e outros ligantes do endotélio, enquanto que VLA-4 se liga a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) e aos componentes da matriz como a fibronectina. Adesão firme é facilitada por dois eventos: aumento da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 pelo endotélio induzido por IL-1, TNF- α ou LPS e um aumento na afinidade das integrinas dos leucócitos por seus ligantes expressos pelas células endoteliais. Apesar da ligação das integrinas dos leucócitos a seus ligantes endoteliais estabelecerem adesão firme, esta interação não é permanente. O leucócito passa através dos espaços intercelulares das células endoteliais através da interação de ELAM (*Endothelial-leukocyte Adhesion Molecule*) expressas pelos leucócitos, cujos ligantes não são atualmente conhecidos. Os leucócitos são guiados através do tecido até seu destino final por quimiocinas produzidas no local da injúria e difundidos pela corrente sangüínea. Finalmente os leucócitos chegam até o sítio inflamatório e desempenham suas funções de defesa do organismo (Springer, 1994, Mollinedo et al., 1999, Steeber et al., 1999).

A infiltração de neutrófilos ativados até o foco infeccioso tem sido considerada causa principal no desenvolvimento de algumas doenças inflamatórias como injúria após isquemia e reperfusão, artrite, lupus eritematoso sistêmico e disfunção de múltiplos órgãos associada a trauma e sepse. Por outro lado a presença dos neutrófilos no foco infeccioso é de grande importância na resolução da infecção.

Como exemplo da importância da migração de neutrófilos para a resolução da doença, Verdrengh & Tarkowski, 1997, demonstraram que animais depletados de neutrófilos apresentavam sinais graves da sepse, com alta mortalidade, sugerindo que a fagocitose por neutrófilos é uma etapa crítica para a resolução da doença, na fase inicial da infecção por *S.aureus*.

Por outro lado, a migração exagerada destas células a órgãos vitais pode ser letal. Uma análise feita em pacientes com bacteremia por *S.aureus* demonstrou que aqueles que apresentavam maiores níveis de E-selectina e VCAM-1 no soro apresentavam também endocardite e por conseqüência um pior prognóstico (Soederquist et al., 1999).

Corroborando com estes dados Hongh Xu et al., 1994 demonstraram que animais deficientes para a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) se tornam resistentes ao choque endotoxêmico, provavelmente em virtude de redução drástica do recrutamento de neutrófilos para o fígado, quando avaliada 24h após a administração do LPS. Mais recentemente animais deficientes para integrinas $\beta 1$ e $\beta 2$, após receberem LPS por via intraperitoneal, apresentaram reduzida migração de neutrófilos para o fígado, conseqüentemente menor lesão do órgão, quando comparado com animais normais, mesmo apresentando altos níveis plasmáticos de IL-1 e TNF (Lowell & Berton, 1998).

1.6.1 - Alterações no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório

A presença de fatores inibitórios da migração de neutrófilos para o foco inflamatório ou infeccioso já foi descrita em diversas doenças. A Síndrome da Imunodeficiência adquirida (AIDS), por exemplo, está associada a alto índice de infecções oportunistas, muitas decorrente de infecções bacteriana. Pacientes com AIDS apresentam anormalidade nas funções dos neutrófilos, variáveis de acordo com o estágio da doença (Elbim et al., 1995). O soro de pacientes com AIDS inibiu a quimiotaxia de neutrófilos de indivíduos normais e o soro de indivíduos normais restabeleceu a capacidade quimiotáxica dos neutrófilos de pacientes aidéticos. A presença de fator sorológico termolábil foi apontada como responsável pelo efeito inibitório sobre a motilidade dos neutrófilos circulantes (Ellis et al., 1998).

Em indivíduos alcoólatras e em certos casos de cirrose hepática há uma diminuição da quimiotaxia de neutrófilos. Esta disfunção foi associada a presença de inibidores de quimiotaxia no soro e ao número deficiente de componente do sistema complemento (DeMeo & Andersen, 1972).

Indivíduos portadores da LAD (“Leukocyte adhesion deficiency”) que não expressam a molécula de adesão CD11b/CD18 presentes em leucócitos (também denominada de MAC-1: integrina responsável pela adesão firme entre estas células e o endotélio) apresentam infecções de evolução lenta e necrótica, normalmente observadas na pele, no trato gastrointestinal e em mucosas, devido á ineficiência da migração de neutrófilos para os focos infecciosos.

Na sepse, ainda que o número de neutrófilos circulantes possa aumentar, é possível que estas células apresentem alterações nas funções de quimiotaxia, fagocitose e

atividade bactericida intracelular (Territo & Golde, 1976; Smith et al., 1977; Van Dijk et al., 1980; Rocha e Ferreira, 1986; Dong et al., 1993). A diminuição da capacidade de neutrófilos de migrar para os sítios inflamatórios pode ser mediada pela presença de TNF- α e IL-8 na circulação. Essas citocinas, assim como o LPS, embora apresentem atividade pró-inflamatória, quando presentes na circulação, são capazes de inibir o recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso (Otsuka et al., 1990; Hechtman et al., 1991; Cunha & Tamashiro, 1992). Elas também apresentam atividade inibitória sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, induzida por C5a, LTB4 (Otsuka et al., 1990) ou FMLP (Otsuka et al., 1990; Cunha & Tamashiro, 1992; Ley et al., 1993).

Outro mediador inflamatório que participa na redução da migração neutrofilica para o foco infeccioso é o NO. Este fato foi primeiramente demonstrado em preparações *in vivo* com vênulas do mesentério de gatos, nos quais a perfusão com L-NMMA ou L-NAME aumentou a adesão de leucócitos. Este efeito foi revertido pelo anticorpo anti-CD18 (Kubes et al., 1991). É interessante observarmos que apesar dos neutrófilos não migrarem para o foco infeccioso durante a sepse; estas células aderem a microcirculação de certos órgãos como fígado e pulmão contribuindo para a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos, discutida anteriormente.

Neste contexto podemos postular que a redução da migração de neutrófilos favorece a proliferação de microrganismos e a evolução da doença. Este é um fator que contribui significativamente para a alta mortalidade observada na sepse. Esta hipótese pode ser confirmada através da utilização de dois modelos distintos, endotoxemia e CLP (do inglês – *cecal ligation and puncture*), obtidos em nosso laboratório. Tavares-Murta et al., 1998 demonstraram que a ação inibitória do LPS sobre a migração de neutrófilos é indireta, pela liberação de mediadores inflamatórios. Esse efeito não se deve apenas a liberação de TNF- α , pois o anticorpo anti-TNF preveniu parcialmente a redução da migração de neutrófilos causada pela administração da endotoxina em camundongos. A presença de outros mediadores como a IL-8 e o MNCF (fator quimiotático para neutrófilos liberado de macrófagos) na circulação também são responsáveis pela diminuição da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. Também se demonstrou que o pré-tratamento dos camundongos com inibidor da NOS, L-NMMA, preveniu o efeito inibitório do TNF- α , IL-8 e do MNCF sobre o recrutamento de neutrófilos induzido pela administração i.p. de tioglicolato, sugerindo a participação do NO nesse fenômeno. Em outro modelo experimental de sepse, a CLP em

camundongos, Benjamim et al., demonstraram a redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais com lesão do colo intestinal levando o animal ao óbito. Esta redução da migração correlaciona-se com a alta mortalidade observada na doença. O mediador que pode estar participando deste fenômeno parece ser o NO, já que o pré-tratamento destes animais com D-penicilamina e aminoguanidina (“scavenger” de NO e inibidor da NO sintase induzida, respectivamente) previnem a redução da migração dos neutrófilos e melhoram significativamente a sobrevivência destes animais (Benjamim et al., 2000).

Em conclusão, podemos dizer que a redução da migração de neutrófilos é um fator regulador na sepse, em diferentes modelos experimentais.

Diante de algumas evidências experimentais sobre a fisiopatologia da sepse tais como:

1 – migração neutrofílica para o foco infeccioso é um fator fundamental na resolução da doença (Verdengh & Tarkowski, 1997).

2 – em modelo experimental de endotoxemia e CLP observa-se redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso; como consequência instala-se um pior prognóstico para os animais (Tavares-Murta et al., 1998; Benjamim et al., 2000).

3 – o óxido nítrico regula negativamente a adesão dos leucócitos às células endoteliais, etapa limitante para a migração do neutrófilo até o sítio inflamatório (Hickey et al., 1997).

4 – O NO possui importante papel de defesa do hospedeiro através de seu efeito microbicida (Fierro et al., 1996; Silva et al., 1995, Fierro, 1999).

Traçamos alguns objetivos a seguir apresentados (item 2)

2 – Objetivos

Com base nas evidências experimentais apresentadas anteriormente objetivamos neste estudo:

a – Padronizar o modelo de sepse induzida por *Staphylococcus aureus* através da análise de alguns parâmetros como: sobrevivência, alterações no leucograma, presença de bactérias no exsudato peritoneal e bacteremia, quantificação de citocinas no soro e exsudato, monitoração da pressão arterial dos animais em sepse e análise da histologia de órgãos vitais durante esta síndrome.

b – Caracterizar o fenômeno da redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso, neste caso a cavidade peritoneal.

c - Correlacionar o maior ou menor recrutamento dos neutrófilos, na cavidade peritoneal, com o número de bactérias nesta cavidade e no sangue.

d – Investigar a participação de citocinas como TNF- α e IFN- γ na redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso

e – Analisar o possível papel do NO na redução da migração de neutrófilos, neste modelo experimental de sepse.

f – Identificar o tipo de célula residente, que pode ser a fonte de mediadores envolvidos na redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso.

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Animais utilizados

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57Bl/6, machos (em sua maioria) e fêmeas pesando 18-22g, provenientes do biotério da Universidade Estadual de Campinas (Centro Multi-Institucional de Bioterismo - CEMIB). Camundongos C57Bl/6 deficientes ("knockout") para o receptor p55 do TNF, para a citocina IFN- γ e para a enzima NO sintase induzida foram obtidos do biotério do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura (23-25°C) e o ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água.

3.2 – Obtenção das bactérias.

Liofilizado de *Staphylococcus aureus* foi obtido da ATCC (do inglês - *American Type Culture Collection*), número 25.923. Primeiramente foi verificada a presença de colônias puras neste liofilizado, através do cultivo e semeadura de uma pequena amostra. Após a verificação da pureza, maiores quantidades de liofilizado foram obtidas. Para cada experimento, 18 horas antes do mesmo, pequenas quantidades do liofilizado foram semeadas em caldo BHI líquido e mantido a 37° C. Após este período, o meio era centrifugado e as bactérias ressuspensas em PBS (do inglês = *Phosphate Buffer Saline*) esterilizado. A concentração dos inóculos utilizada foi obtida através da comparação colorimétrica com a escala de McFarland e confirmada pela semeadura de cada suspensão bacteriana em placa de petri com BHI-ágar (ver item III.3). O número unidades formadoras de colônias (UFC) foi expresso como: UFC/cavidade para exsudato peritoneal e UFC/ ml para o sangue.

3.3 – Modelo experimental de sepse.

Os animais receberam inóculos contendo concentrações diferentes de bactérias, embora todos eles foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), 500 μ l/animal. Alguns animais foram observados quanto a sobrevivência até o sétimo dia após o inóculo, enquanto que outros foram sacrificados em tempos determinados para a análise dos

diferente parâmetros, são eles: migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, presença de bactérias no exsudato peritoneal e sangue.

3.4 - Quantificação das colônias de *S.aureus* obtidas do exsudato peritoneal e sangue.

Camundongos receberam inóculo subletal e letal de bactérias e foram anestesiados com éter 4, 6, 12 e 24h após a administração de bactérias. Para a obtenção de amostras de sangue para o estudo da bacteremia, os animais foram submetidos à punção cardíaca e para a quantificação do número de bactérias presentes no exsudato, lavou-se a cavidade peritoneal com 1 ml de PBS sem heparina. O exsudato foi então diluído (1:100; 1:1000) em PBS, e 10 µL desta solução semeada em placas de Petri contendo meio cultura ágar Mueller Hinton (MHA). 5µl de amostra de sangue foi diretamente semeada em meio Mueller-Hinton Ágar. Todo o procedimento foi realizado com soluções e materiais esterilizados e em câmara de fluxo laminar. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 18 h a 37°C e o número de colônias foi contado. Cada amostra foi semeada em triplicata.

3.5 - Leucograma

Camundongos que receberam inóculo letal e subletal foram anestesiados em câmara de éter 2, 4, 6, 12 e 24h após a administração das bactérias e 20 µL de sangue foi coletado por uma pequena incisão na extremidade da cauda, que foi imediatamente cauterizada. Cinco microlitros de EDTA K3 (15%) foram adicionados na amostra de sangue e a contagem total foi realizada em contador automático de células (Coulter Ac.T) e expressa como n° de células x 10⁶ células/mL. A contagem diferencial foi feita como descrito no item 3.7.2.

3.6 – Histologia dos órgãos

Os animais receberam inóculos letal e subletal e após diferentes tempos (4, 6 e 12 horas) foram sacrificados em câmara de éter. A perfusão foi realizada com solução salina isotônica (20 ml) e em seguida com formol 10%, no mesmo volume da salina. Um fragmento dos órgãos como coração, pulmões e rins foram retirados e mantidos em formol a 10% por 24 horas, sendo então transferidos para álcool 70% até o

processamento dos mesmos. O material foi desidratado, diafanizado, embebido em parafina e incluídos para os cortes histológicos. Cortes de 5 μm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina e montadas sob lamínulas com Entellan.

3.7 – Monitorização da pressão arterial.

A manipulação e registro da pressão arterial dos camundongos foram baseados em Franchini et al, 2000 e Inoue et al., 2000. Resumidamente, todo o procedimento cirúrgico foi realizado em condições assépticas. Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de ketamina (70 mg/kg, ip) e diazepam (6 mg/kg, ip) e foram mantidos em mesa cirúrgica de temperatura controlada a 37°C. Uma hora após a canulação da artéria femoral, grupos distintos de animais receberam inoculação subletal ou letal. O registro da pressão arterial foi realizado 4 horas após as inoculações.

3.8 - Migração de neutrófilos

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos normais e administrados com inóculo subletal ($0,5 \times 10^9$ Unidade Formadoras de Colônias/cavidade) (UFC/cavidade) e letal (16×10^9 UFC/cavidade) de bactérias foi avaliada em tempos determinados (2, 4, 6, 12 e 24h) após administração de bactérias. Animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal lavada com 2 ml de PBS/heparina. Neste lavado avaliou o número total e diferencial das células presentes.

3.8.1 - Contagem total

A contagem total foi realizada em Câmara de Neubauer, para 20 μl de exsudato foi pipetado em 380 μl de solução de Turk. Os resultados foram expressos como n° de células $\times 10^6$ / cavidade.

3.8.2 - Contagem diferencial

A contagem diferencial foi feita a partir de esfregaços preparados em papel de filtro e corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa (Rosenfeld). Células foram examinadas em microscópio óptico na objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 vezes), sendo contadas 100 ou 200 células por lâmina, diferenciando-se três tipos: neutrófilos, eosinófilos e mononucleares. A quantidade de cada tipo celular presente na cavidade peritoneal ou em amostras de sangue foi calculado pela porcentagem dessas

células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtida na contagem total. Os resultados foram expressos como n° de cada tipo celular x 10⁶/ ml.

3.8.3 - Migração *in vitro* dos neutrófilos

O sangue dos animais injetados com inóculos subletal, letal ou pré-tratados com aminoguanidina (30mg/Kg, 30 minutos antes da administração das bactérias com inóculo letal) foi obtido por punção retro-orbital. Três horas após a inoculação dos animais o sangue foi colhido. Neutrófilos foram purificados por centrifugação em gradiente de “Ficol-Hypaque” modificado (NIM™2), como descrito pelo fornecedor. Após a obtenção dos neutrófilos verificou-se: 1 - a viabilidade destas células através do teste de exclusão com Azul de Tripán, sob microscópio óptico. A viabilidade variava de 95-100%; 2 - contagem diferencial da suspensão celular (porcentagem de neutrófilos era aproximadamente de 80-90%). A suspensão final continha 0,5x10⁶ neutrófilos/ml e 50µl desta solução foi colocada em cada poço. O ensaio foi realizado em microcâmaras de quimiotaxia de 48 poços (Neuro Probe, Cabin John, MD), separadas por uma membrana de policarboneto contendo poros de 5µm (Millipore, Bedford, MA, USA). Para o teste, 50 µl do peptídeo fMLP (N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina) (10⁻⁶ ou 10⁻⁷M) ou leucotireno B₄ (LTB₄) diluído em RPMI-BSA foram colocados nos poços da câmara inferior e 50 µl das suspensões de neutrófilos (10⁶ células/ml) adicionados a câmara superior. As câmaras foram incubadas a 37°C, por uma hora, em 5% de CO₂. Após os filtros foram removidos, fixados e corados (Diff-Quick Stain Kit; American Scientific Products, MacGraw Park, IL)

Para cada poço foram contados 5 campos distintos. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/campo.

3.9 - Alterações das populações celulares

Os tratamentos foram realizados em diferentes grupos experimentais da seguinte forma:

3.9.1 - Aumento da população de macrófagos da cavidade peritoneal.

Com o intuito de aumentar a população de macrófagos residentes, um grupo de animais recebeu 2 mL de tioglicolato 3% i.p. (Souza et al., 1988). Quatro dias após a injeção, os animais receberam inóculo letal e subletal de bactérias ou apenas PBS como controle. Quatro horas após a administração das bactérias a migração de neutrófilos e quantificação das colônias foram observadas, enquanto que outro grupo submetido ao mesmo tratamento foi observado por 7 dias para avaliação da sobrevivência.

3.9.2 - Redução da população de mastócitos

Para a redução da população de mastócitos foram utilizados dois protocolos distintos:

1- administração de 2 mL de H₂O destilada i.p. (Mendonça et al., 1986). Quarenta e oito horas após, os animais receberam inóculo letal e subletal de bactérias. Quatro horas após a administração de bactérias, a migração de neutrófilos foi observada, enquanto que outro grupo submetido ao mesmo tratamento foi observado por 7 dias para avaliação da sobrevivência.

2 – Duas doses diárias do composto 48/80 (Di Rosa et al., 1971), por 4 dias consecutivos, i.p., no volume de 500 µl/ animal, seguindo o esquema abaixo descrito:

1º dia: 0,6 mg/ Kg.

2º dia : 1 mg/ Kg.

3º dia: 1,2 mg/ Kg.

4º dia: 2,4 mg/ Kg.

Vinte e quatro horas após a última dose de 48/80 os animais receberam inóculo letal e subletal de bactérias. Quatro horas após a administração de bactérias a migração de neutrófilos e quantificação de colônias foram observadas, enquanto que outro grupo submetido ao mesmo tratamento foi observado por 7 dias para avaliação da sobrevivência.

A contagem do número de mastócitos no lavado peritoneal foi realizado com o corante Azul de Toluidina.

3. 10 - Efeito de agentes farmacológicos que interferem com o NO

Com a finalidade de investigar a participação do NO na redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, os animais receberam os seguintes tratamentos com aminoguanidina (Griffiths et al., 1993):

1 - Aminoguanidina (10, 20 e 30 mg/kg⁻¹/0,2 ml s.c.) 30 minutos antes da inoculação letal.

2 - Aminoguanidina (30 mg./kg⁻¹/0,2 ml s.c.) 30 minutos antes da inoculação letal de bactérias e 5 mg/Kg 6 h após a administração de bactérias na inóculo letal,

3 – Aminoguanidina (30 mg. .kg⁻¹/ 0,2 mL/s.c.) 30 minutos antes da inoculação subletal e 30 mg./kg⁻¹/0,2 mL s.c) 2 horas após a administração das bactérias no inóculo subletal.

5 - N- ω -nitro-L-arginina (Furfine et al., 1993) (30 mg. .kg⁻¹/ 0,2 mL/ s.c.) 30 minutos antes da inoculação letal.

6 - D-Penicilamina (10, 20 e 40 mg. .kg⁻¹ /0,1 mL/ i.v.) 30 minutos antes da inoculação letal.

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e a quantificação das colônias de bactérias foram avaliadas 2, 4, 6, 12 ou 24 horas (Fig.7) após as inoculações, dependendo do grupo experimental, enquanto para a avaliação da sobrevivência os animais foram observados por 7 dias, para todos os grupos experimentais.

3.11 - Dosagem de TNF- α , IL-1 β e IL-10

Os soros e exsudatos foram coletados 4 h após as inoculações para a quantificação de TNF- α , IL-1 β e IL-10. Para a dosagem das citocinas utilizamos o protocolo de ELISA descrito a seguir:

3.11.1- TNF- α e IL-1 β

- As placas foram tratadas com 2 μ g/mL de anticorpo anti-TNF- α (H92 ou XT 22.11) ou anti-IL-1 β (S5/B3) (anticorpo de captura) diluído em tampão bicarbonato - 100 μ L/poço (placa de 96 poços) por 16-24h a 4°C.

- Após este período de incubação procedeu-se com a lavagem das placas (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v.

- O bloqueio foi realizado com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μ L/ poço por 2h à temperatura ambiente.

- Após o bloqueio as placas foram novamente lavadas (3x).

- Em seguida a curva padrão de TNF- α (2000-4,88 pg/mL) ou IL-1 β (2000-1,95 pg/mL) diluídas em tampão de lavagem e as amostras a serem dosadas (100 μ L/poço por 16-24h a 4°C) foram incubadas.
- Lavagem da placa (3x).
- A curva padrão e as amostras foram incubadas com anticorpo biotilado anti-TNF- α (H92) ou anti-IL-1 β (S329/B4) (anticorpo de detecção) diluído 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1h à temperatura ambiente.
- Lavagem da placa (3x).
- Toda a placa foi incubada com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μ L/ poço por 15 minutos à temperatura ambiente.
- Lavagem da placa (3x).
- Adicionou-se o-fenilenediamina dihidroclorato (OPD) em tampão substrato, 100 μ L/ poço, protegendo a placa da luz e deixou incubando por 5-20 min à temperatura ambiente.
- A reação foi interrompida com 150 μ L/ poço de H₂SO₄, 1M.
- A leitura foi feita em 490 nm.

3.11.2 - IL-10

- A placa foi incubada com 1 μ g/mL de anticorpo anti-IL-10 (JE5052A5) (anticorpo de captura), diluído em tampão bicarbonato (100 μ L/ poço por 16-24h a 4°C).
- Lavagem da placa (6x) com PBS-tween 20, 0,05% v/v.
- O bloqueio foi realizado com leite em pó Molico 5% diluído em H₂O, 250 μ L/ poço por 2h à temperatura ambiente.
- Lavagem da placa (6x).
- A curva padrão para IL-10 (10000-9,76 pg/mL) foi diluída em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100 μ L/ poço por 16-24h a 4°C) foram pipetadas na placa.
- Lavagem da placa (6x).
- Incubação com 0,5 μ g/mL de anticorpo biotilado anti-IL-4 (30340.11), anti-IL-10 (JE5052A5) ou anti- IFN- γ (37875.11) (anticorpo de detecção) diluído em PBS (100 μ L/ poço por 2h a 37°C).

- 15 min antes de terminar a incubação com o anticorpo biotilado, preparou-se a solução AB (Kit avidina peroxidase; VECTOR - 1 gota sol. A + 1 gota sol. B em 10 mL de PBS)..
- Lavagem da placa (6x).
- Ao final da tempo de incubação, adicionou-se a solução AB (100 µL/ poço) por 1h a 37°C
- Lavagem da placa (10x).
- Incubação com o substrato OPD em tampão substrato, 100 µL/ poço, protegendo a placa da luz e por 10 min à temperatura ambiente.
- A leitura foi feita em 490nm.

3.12 - Análise estatística

Nos experimentos, a que demos tratamentos distintos, aplicou-se o teste de análise de variância (ANOVA) para comparar as significâncias estatísticas entre eles. Em todos os casos, comparações individuais foram testadas com teste t de Bonferroni (comparações múltiplas) ou teste t de Student (comparações entre duas amostras) para amostras não pareadas. O número (n) de animais por grupo experimental está descrito nas figuras. Os resultados foram expressos como média \pm epm e as diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes para $P < 0,05$. Para a análise estatística das curvas de sobrevida foi utilizado o teste Mantel-Cox logrank (χ^2 "chisquared"), e as diferenças foram consideradas estatisticamente para $P < 0,05$. As curvas de sobrevida foram expressas como percentagem de camundongos vivos observados em um intervalo de 24h, durante os 7 dias avaliados, como é demonstrado a seguir:

$$\% \text{ de sobrevida} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de animais vivos até o intervalo de tempo avaliado}}{\text{n}^\circ \text{ de animais no início do experimento}} \times 100$$

3.13 - Soluções

Caldo B.H.I. (caldo de infusão de cérebro e coração) (Oxoid)

B.H.I.....37g

Água Mille-Q q.s.p.....1L

Meio Mueller Hilton com Ágar (M.M.H.)

Mueller Hinton (Difco).....38g
 Ágar-Ágar.....1,5g
 Água Mille-Q q.s.p.....1L

Corante de azul de toluidina

Azul de toluidina.....0,10 g
 Ácido acético.....1 mL
 Formaldeído 4%.....10 mL
 Água destilada.....89 mL

Corante de exclusão de Azul de Tripán (viabilidade celular)

Azul de Tripán (Sigma).....100mg
 PBS q.s.p.100ml

Corante Pancrônico de Rosenfeld

Giemsa-Azul-Eosina-Azul de Metileno (Merck).....0,97 g
 May-Grunwald-Eosina-Azul de Metileno (Merck).....0,53 g
 Metanol P.A. (Reagen) q.s.p.....1 L

Solução de Tioglicolato 3%

Meio Fluido de tioglicolato (Difco).....3,0 g
 Água Mille-Q q.s.p.....1 L

A solução foi aquecida em forno de microondas, em temperatura máxima, durante 5 min, sendo a seguir resfriada. A solução foi autoclavada (127°C) e estocada em temperatura ambiente, por no mínimo 3 meses antes do uso.

Tampão PBS/EDTA utilizado na lavagem peritoneal

EDTA K3 (15%).....37,2 mg
 PBS.....100 ml

Tampões utilizados para o ensaio de ELISA

Tampão bicarbonato pH 8.2 (TNF- α e IL-1 β)

NaHCO₃.....0,1 M
 NaCl0,1 M

Tampão bicarbonato pH 9.8 (IL-10)

Carbonato de sódio (1 parte).....1 M
 Bicarbonato de sódio (1 parte).....1 M
 Diluição para 0,06M

Tampão substrato pH 5.0

Ácido cítrico.....34,7 mM
 Na₂HPO₄.....66,7 mM

Substrato

OPD.....	0,4 mg
H ₂ O ₂	0,4 µl
Tampão substrato q.s.p.....	1 ml

3.14 - Drogas e Reagentes

- Aminoguanidina (RBI) - dissolvido em PBS
- D-Penicilamina (Sigma) - dissolvido em PBS
- 48/80 (Sigma) – dissolvido em PBS
- o-Fenilenediamina dihidroclorato (OPD) (Sigma) - dissolvido no tampão substrato descrito no protocolo de ELISA.
- NIM™ ●2 – Cardinal Associates, Inc.

3.15 - Citocinas e anticorpos

Os soros anti-TNF- α e anti-IL-1 β e as citocinas recombinantes (IL-1 β rm e TNF- α rm) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Steeve Poole da National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Inglaterra.

Os anticorpos monoclonais para IL-10 e as citocinas recombinantes murinas (IL-10rm) foram comprados na R&D System.

4 – Resultados

4.1 - Padronização do modelo experimental de sepse

Com o objetivo de se caracterizar o modelo experimental de sepse induzido pela administração de *Staphylococcus aureus*, foram avaliados alguns parâmetros abaixo descritos:

4.1.1 - Sobrevida e migração de neutrófilos

Inicialmente, foi observada a sobrevida e o perfil da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos que receberam diferentes inóculos de bactérias. A fig.1.A mostra a curva de sobrevida dos animais após a administração intraperitonealmente de *S.aureus* nos seguintes inóculos: 0,01; 0,05; 0,5; 3 e 16×10^9 UFC/ 500 μ l/ cavidade. Nos inóculos 0,01; 0,05; $0,5 \times 10^9$ UFC/cavidade observamos que todos os animais sobreviveram nos 7 dias de observação. Já o inóculo de 3×10^9 UFC/cavidade levou a óbito 50% dos animais, 24 h após a administração das bactérias, permanecendo assim por 7 dias. O maior inóculo bactérias, que causou a morte de 100% dos animais nas primeiras 24 h foi 16×10^9 UFC/cavidade. A Fig.1.B mostra o perfil de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após a administração dos mesmos inóculos utilizados na observação da sobrevida. Nos inóculos de 0,01; 0,05 e $0,5 \times 10^9$ UFC/cavidade observamos número crescente de neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal. No inóculo de 3×10^9 UFC/cavidade observamos uma tendência na diminuição de neutrófilos nesta cavidade, embora não seja estatisticamente significativa. O inóculo de 16×10^9 UFC/cavidade promoveu uma redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Esta redução é estatisticamente diferente quando comparada com a migração de neutrófilos induzida pela inóculo de $0,5 \times 10^9$ UFC/cavidade (inóculo que induziu a migração do maior número de neutrófilos). Diante destes resultados denominou-se: a - inóculo subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/cavidade) que corresponde com a sobrevivência de todos os animais e induziu maior número de neutrófilos para a cavidade peritoneal; b - inóculo letal (16×10^9 UFC/cavidade) levou a morte de 100% dos animais e redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

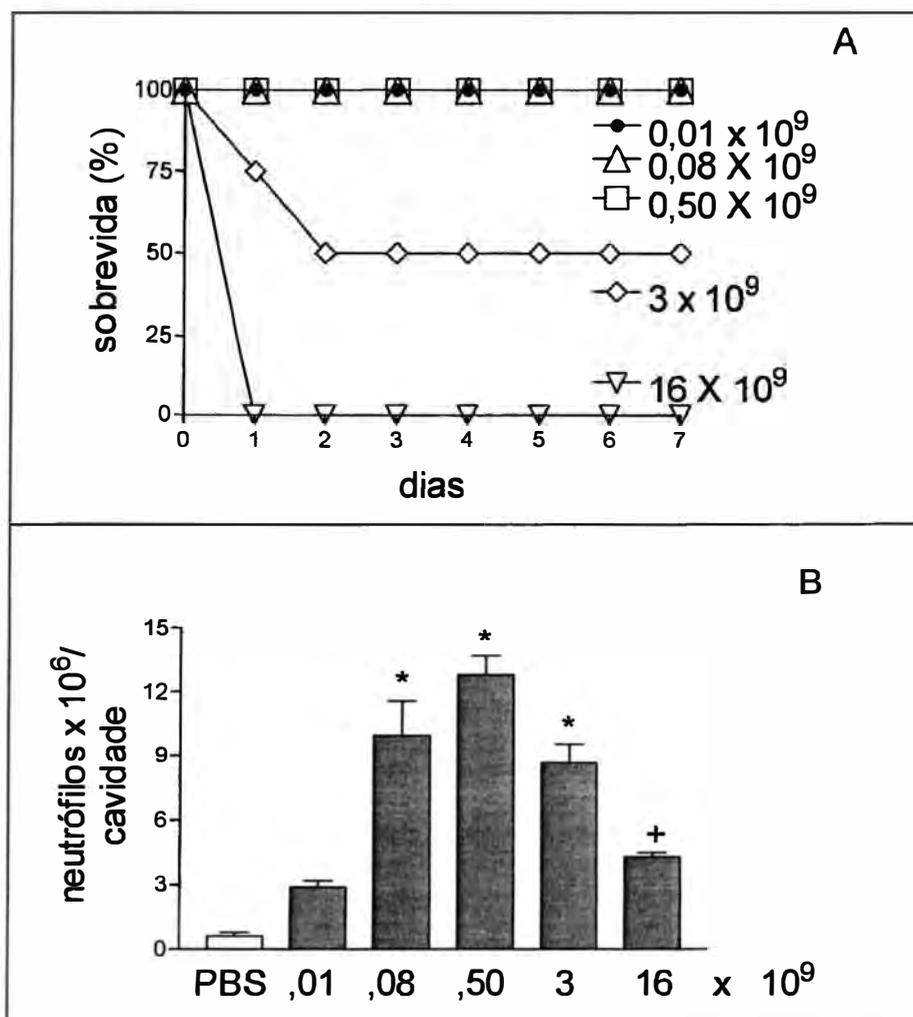


Fig. 1: Curva de sobrevivência e de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos que receberam diferentes inóculos de *S.aureus*. Camundongos receberam diferentes inóculos de *S.aureus* (0,01; 0,05; 0,50; 3; 16 x 10⁹ UFC/ cavidade/ 500μl, i.p). **A:** Sobrevivência foi observada até o sétimo dia após a administração das bactérias. **B:** Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais foi analisada 4 h após a inoculação. * P< 0,01 estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (PBS). + P<0,05 estatisticamente significativa ao grupo que recebeu 0,5x10⁹ UFC/ cavidade/ 500 i.p. Figura representativa de 3 experimentos independentes. Cada grupo experimental possuía n=5. Resultados expressos como média ± epm.

4.1.2 – Cinética da migração de neutrófilos e da quantidade de bactérias no exsudato e sangue

Na Fig.2 foram analisadas a migração de neutrófilos para o foco infeccioso, o número de bactérias presentes no exsudato e sangue dos animais que receberam inóculo subletal e letal. Após 2, 4, 6, 12 e 24 horas das inoculações, os diferentes parâmetros foram analisados. A Fig.2A mostra que a migração de neutrófilos em animais que receberam inóculo subletal é crescente nos períodos de 2, 4 e 6 horas após a administração das bactérias, sendo o máximo da migração observada após 6 horas. A partir deste período observamos diminuição gradativa do número de neutrófilos para esta cavidade. Já a migração de neutrófilos dos animais que receberam inóculo letal é sempre menor em todos os períodos observados. A Fig.2B representa o número de bactérias presentes no exsudato peritoneal dos animais em diferentes tempos após as inoculações. Observamos que animais que receberam inóculo subletal apresentaram quantidades menores de bactérias nos tempos observados. Por outro lado, os animais que receberam inóculo letal apresentaram quantidades crescentes de bactérias no exsudato sendo que a 12^a hora é a que apresenta maior quantidade. A bacteremia foi apresentada na Fig.2C. Mais uma vez, animais que receberam o inóculo letal apresentaram maior quantidade de bactérias no sangue do que aqueles que receberam inóculo subletal. Não foi analisado nenhum dos parâmetros acima descritos, no período de 24 horas após a inoculação letal, pois todos os animais deste grupo foram a óbito.

4.1.3 - Leucograma

A Tab.1 representa o número de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares circulantes nos grupos que receberam inóculo subletal e letal, analisados 2, 4, 6, 12 e 24 h após a administração das bactérias. Foi também utilizado um grupo de animais injetados com PBS como controle. Observamos neutrofilia estatisticamente significativa na 2^a hora após a administração das bactérias, tanto no grupo que recebeu o inóculo subletal, quanto no grupo que recebeu o inóculo letal. Nesse último grupo, a contagem de neutrófilos voltou aos níveis do grupo controle após 6 horas de observação, enquanto que no grupo que recebera dose subletal houve tendência à manutenção da neutrofilia. A contagem de neutrófilos alcançou valores próximos aos do controle após 24 horas da inoculação letal. O número de eosinófilos

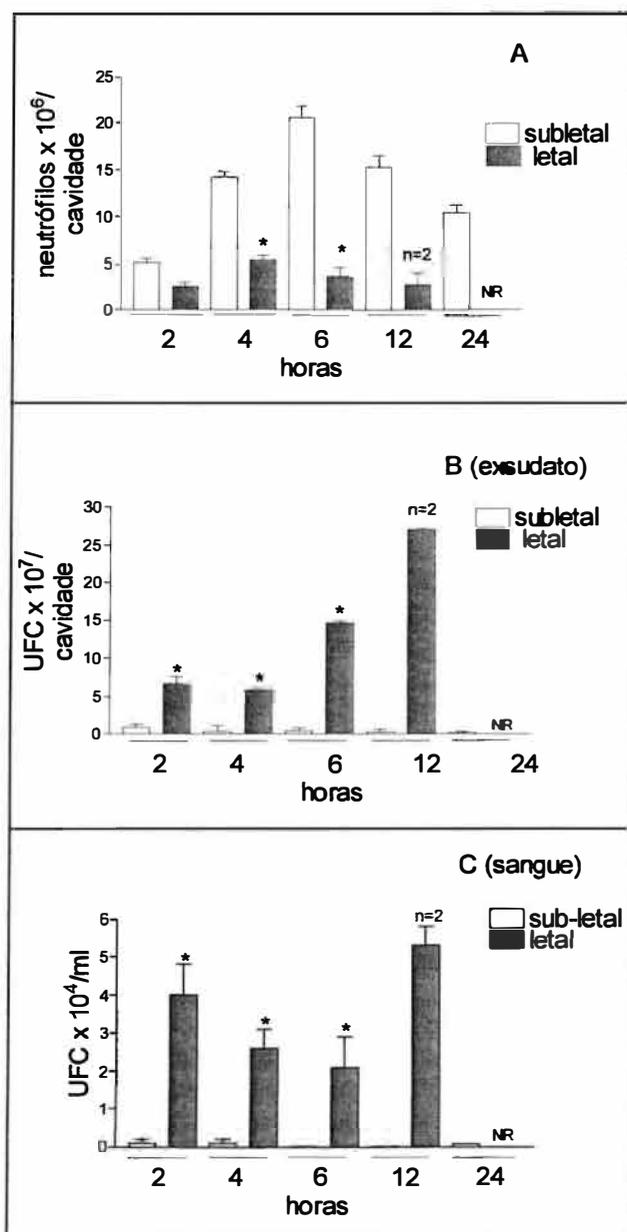


Fig. 2: Cinética da migração de neutrófilos e da quantidade de bactérias no exsudato e sangue de animais que receberam *S.aureus*. Camundongos receberam inóculos subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/cavidade/500 μ l, i.p.) e letal (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.). Os diferentes parâmetros foram analisados 2, 4, 6, 12 e 24 horas após a administração das bactérias. A: Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais. B: Aliquota de exsudato foi semeada e a contagem das colônias foi realizada após 24 h. C: Aliquota de sangue foi semeada e a contagem das colônias foi avaliada após 24 h. * $P < 0,05$ estatisticamente significante em relação ao grupo que recebeu inóculo subletal. Figura representativa de 2 experimentos independentes. Cada grupo experimental possuía $n=5$. Resultados expressos como média \pm epm. NR: não realizado

Tab.1: Leucograma de animais que receberam inóculos subletal e letal de *S.aureus*

Inóculo	Análise celular ¹	tempo (h) após inóculo				
		2	4	6	12	24
PBS	total	13,2 ± 0,6	14,2 ± 1	10,2 ± 1	14 ± 0,1	19,4 ± 1,6
	neu ²	1,6 ± 0,06	3 ± 0,2	3,2 ± 1,6	4 ± 0,6	2 ± 0,1
	mono ³	11,6 ± 0,6	10,4 ± 0,2	7,6 ± 0,8	10 ± 1	16,2 ± 1,4
	eos. ⁴	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0	0,6 ± 0,06
Sub-Letal	total	16 ± 1,2	11 ± 1,8	11,6 ± 1,4	16 ± 2	23 ± 2,8
	neu	8,2 ± 1,2 *	4,6 ± 0,8	6 ± 1	6 ± 0,5	8,8 ± 0,6*
	mono	10,2 ± 0,4	6,2 ± 1,2	5,4 ± 1,8	8,4 ± 0,1	13,2 ± 3
	eos	0,08 ± 0,02	0	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,2	4,4 ± 2,6
Letal	total	15,6 ± 0,6	13,6 ± 0,16	8,6 ± 0,2	7,2 ± 0,9	8,8 ± 0,2 †
	neu.	11,4 ± 0,4 *	6 ± 1,4	4,6 ± 0,2	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,9 †
	mono	4 ± 0,8 +	7,2 ± 0,2	3,8 ± 0,4	4 ± 0,5+	5,6 ± 0,3 †+
	eos	0	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0	0

¹ – valores expressos em 10⁶ células/ml

² – neutrófilos

³ – células mononucleares

⁴ - eosinófilos

Camundongos receberam inóculo subletal (0,5x10⁹ UFC/cavidade/500µl, i.p.) ou letal (16x10⁹ UFC/ cavidade/ 500µl, i.p). Nos diferentes intervalos de tempo (2, 4, 6, 12 e 24 h após a administração das bactérias) amostras de sangue foram coletadas pela veia caudal e contagem total e diferencial dos leucócitos foi realizada. Resultados expressos como média ± epm. † Valores obtidos de 3 animais. * P< 0,001 estatisticamente significante ao número de neutrófilos dos animais controle (PBS). + P<0.01 estatisticamente significante ao número de células mononucleares dos animais controle (PBS). Tabela representativa de 2 experimentos independentes. Cada grupo experimental possuía n = 4.

diminuiu sensivelmente no grupo letal, em todos os tempos estudados. Finalmente foi observada no grupo letal diminuição significativa do número de células mononucleares 12 e 24 horas após a inoculação.

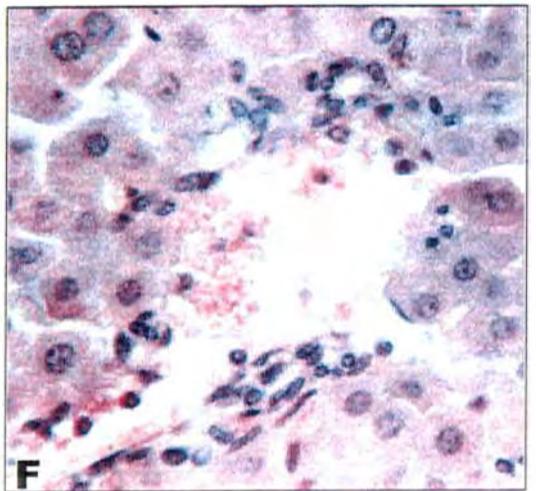
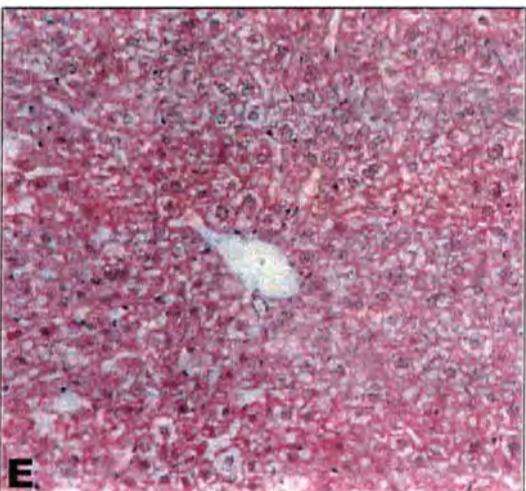
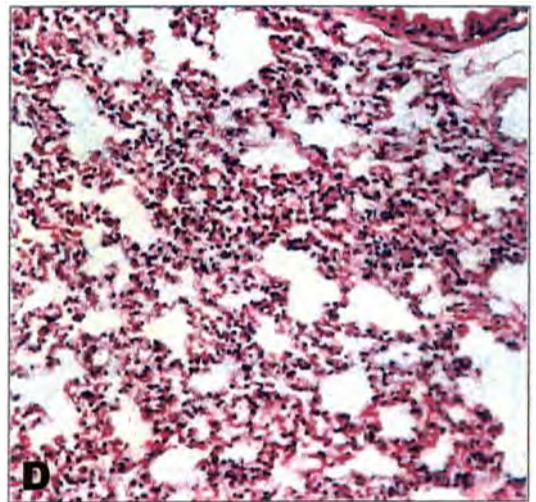
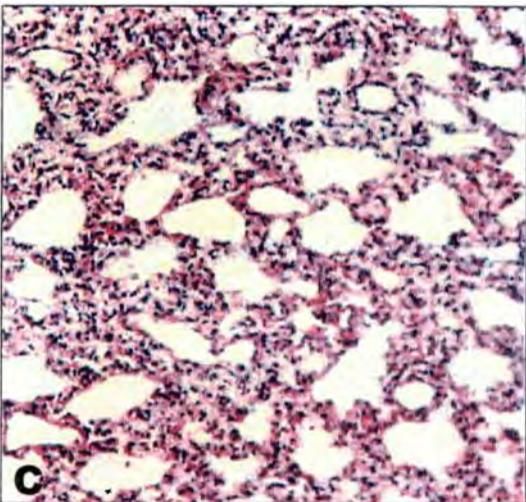
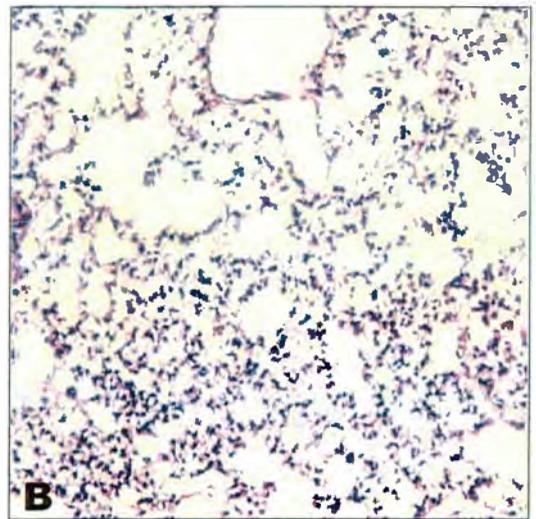
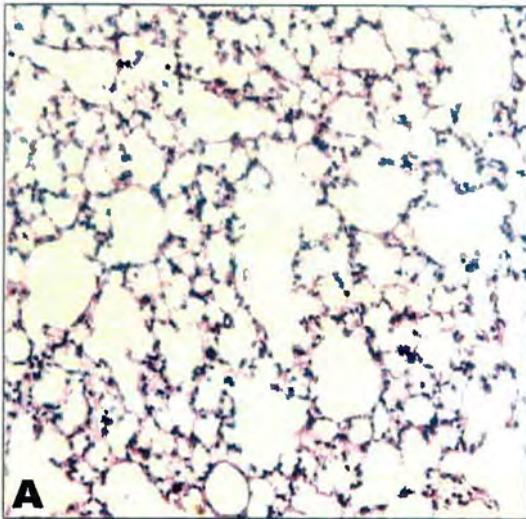
4.1.4 – Histologia dos órgãos

Alguns grupos experimentais foram submetidos à análise patológica para observação de órgãos como pulmões, fígado, rins e coração. Observamos na prancha I, painel B que a secção de pulmão retirado do animal 12 horas após a inoculação letal apresenta infiltrado inflamatório rico em polimorfonucleares. Por outro lado, o animal que foi pré-tratado com aminoguanidina 30 minutos antes da inoculação letal além de apresentar infiltrado inflamatório rico em polimorfonucleares também apresentou extenso edema pulmonar (prancha 1, painel C). Interessante observarmos que os animais deficientes para NOS induzida, também apresentavam intenso infiltrado de células polimorfonucleares e edema pulmonar, mas este quadro já estava instalado apenas 4 horas após a inoculação letal (prancha 1, painel D). O painel A representa pulmão de animal normal apenas para comparação dos demais grupos.

Outro órgão que sofreu alteração foi o fígado do animal observado 12 horas após a inoculação letal, o qual apresentou endotelite, com discreta infiltração de polimorfonucleares no espaço perivascular (prancha 1, painel F). O painel E representar o fígado de uma animal normal para comparação. Os demais órgãos observados como rins e coração não apresentaram alterações no período observado após inoculação letal. Além disto, os animais que receberam inóculo subletal não apresentaram nenhuma alteração nos órgãos estudados (dados não mostrados na prancha).

4.1.5 – Pressão arterial

Outro parâmetro analisado neste modelo experimental de sepse foi a pressão arterial. Para isto a artéria femural foi canulada. Uma hora após o término da cirurgia foi realizada a medida basal da pressão arterial. Após este procedimento, os animais receberam inóculos subletal ou letal de bactérias. Quatro horas após a inoculação, a



Prancha I: Fotomicrografia de órgãos internos dos animais em sepse

A: Secção de pulmão normal. **B:** Secção de pulmão obtido 12 h após a inoculação letal. **C:** Secção de pulmão obtido 12 h após a inoculação letal e pré-tratado com aminoguanidina (30mg/Kg, 30 min. Antes da inoculação letal). **D:** Secção de pulmão de animais deficientes da NO sintase induzida, obtido 4 h após a inoculação letal. **E:** secção de fígado normal. **F:** Secção de fígado obtido 12 h após a inoculação letal

pressão arterial foi novamente monitorada. A Tab.2 mostra que não houve mudanças na pressão arterial dos animais injetados com *S.aureus*, tanto em seu inóculo letal, quanto no inóculo subletal. Animais controle, que não receberam bactérias, foram submetidos a canulação, e não observamos mudança na pressão arterial no tempo estudado (não mostrado em tabela).

Tab.2: Pressão arterial de camundongos inoculados com *S.aureus*.

Inóculo	Pressão Arterial (mmHg)		
	Inicial ¹	Final ²	Δ ³
Subletal	89 \pm 2,8	93 \pm 4,5	+ 4
Letal	81 \pm 2,6	77 \pm 3,4	- 4

1 – uma hora após a cirurgia

2 – quatro horas após inoculação

3 - Δ = PA final – PA inicial

Após canulação da artéria femoral dos animais, procedeu-se com as inoculações. Animais receberam inóculo subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p) ou letal (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p). Figura representativa de 2 experimentos independentes. Cada grupo experimental possuía n=3. Valores representam média \pm epm.

4.1.6 - Quantificação de citocinas no presente modelo de sepse

Como descrito anteriormente em literatura que as citocinas são mediadores importantes em diferentes modelos experimentais de sepse, realizamos dosagens de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no soro e exsudato dos animais em sepse induzida por *S.aureus*.

A presença de TNF- α tanto no exsudato, quanto no soro é maior do que os animais controle (receberam somente PBS), quando dosado 4 horas após as diferentes inoculações com bactérias (Fig.3A e B). Por outro lado, podemos observar que não há diferença nas quantidades de TNF presentes nos três diferentes grupos experimentais: aqueles que receberam inoculação subletal, letal ou ainda pré-tratados com aminoguanidina.

Em relação à presença de IL-1 β no exsudato observamos que é maior quando comparamos com o grupo controle, e além disto a presença desta citocina no grupo letal e no pré-tratado com aminoguanidina é maior do que o grupo subletal (Fig.3C). A presença desta citocina no soro é maior no grupo que recebeu inoculação letal e pré-tratado com aminoguanidina (Fig. 3D).

A citocina IL-10 está presente nos três grupos experimentais tanto no soro quanto no exsudato, quando os comparamos com o grupo que recebeu somente PBS (Fig.3E e F). Observamos ainda que a presença desta citocina no soro dos animais que foram pré-tratados com aminoguanidina é maior do os grupos subletal e letal.

O próximo passo foi analisar a participação do TNF- α e IFN- γ na redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, assim como a presença de bactérias no exsudato peritoneal e sangue e na sobrevivência dos animais inoculados com *Staphylococcus aureus*. Este objetivo foi baseado no fato de que em literatura é descrito sua grande importância na mediação da sepse, bem como mediador da migração celular. Para tal, utilizamos animais deficientes para o receptor p55 de TNF- α e animais deficientes para a produção de IFN- γ .

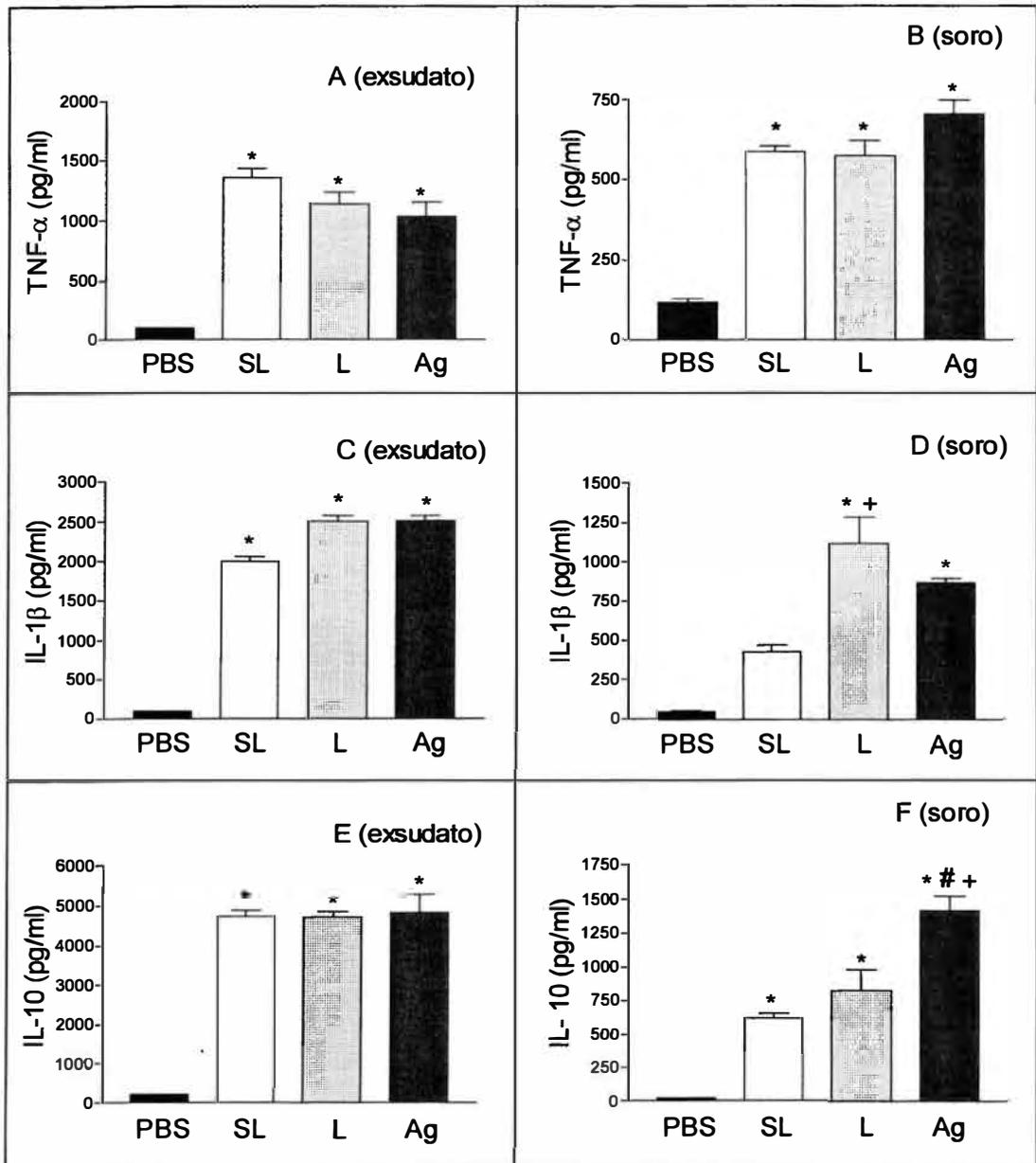


Fig.3: Dosagem de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no exsudato peritoneal e soro dos animais inoculados com *S.aureus*. Quantificação de TNF- α , IL-1 β e IL-10 presente no exsudato peritoneal (painéis A, C e E) e no soro (B, D e F) foi realizada 4 horas após a inoculação subletal (SL) ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) e letal (L) (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) ou dos animais pré-tratados com aminoguanidina (Ag) (30mg/Kg, 30 minutos antes da inoculação letal). Resultados expressos como a média \pm epm e são representativos de 2 experimentos. Cada grupo experimental possuía n=4. * P< 0.05 estatisticamente significativo ao grupo PBS. +P<0.05 estatisticamente significativo ao grupo subletal. # P<0.05 estatisticamente ao grupo letal.

4.2 – Envolvimento de Mediadores na redução da migração de neutrófilos

4.2.1 – Participação do TNF- α

Para se analisar a participação do TNF- α no presente modelo de sepse induzida por *S.aureus* foram utilizados animais deficientes para o receptor p55 de TNF- α . Os animais selvagens e deficientes para o receptor p55 de TNF, que receberam inóculo letal, apresentaram redução da migração dos neutrófilos (Fig.4A). O número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais que receberam inoculação subletal se manteve sempre maior do que aqueles que receberam inóculo letal, seja ela observada 4 ou 12 horas após a inoculação. Conforme observamos na Fig.4B a maior quantidade de bactérias no exsudato de animais que receberam inóculo letal é semelhante para animais selvagens e deficientes. Além disto, observamos que somente nos animais deficientes que receberam inoculação subletal e foram observados 12h após apresentavam quantidade de bactérias maior em seu exsudato. A bacteremia dos animais que receberam inoculação letal é maior tanto nos animais selvagens, quanto nos animais deficientes (Fig.4C). É interessante observar que os animais deficientes que receberam inóculo subletal, observados 12h após, não apresentavam bactérias no sangue. Em relação à sobrevida dos animais, observamos que 100% dos animais selvagens e deficientes que receberam inóculo letal morreram em 24 horas. No grupo dos animais deficientes que receberam inóculo subletal, observamos 25% de sobrevida, ao contrário do grupo controle (selvagens que receberam inóculo subletal) que apresenta 100% (Fig.4D).

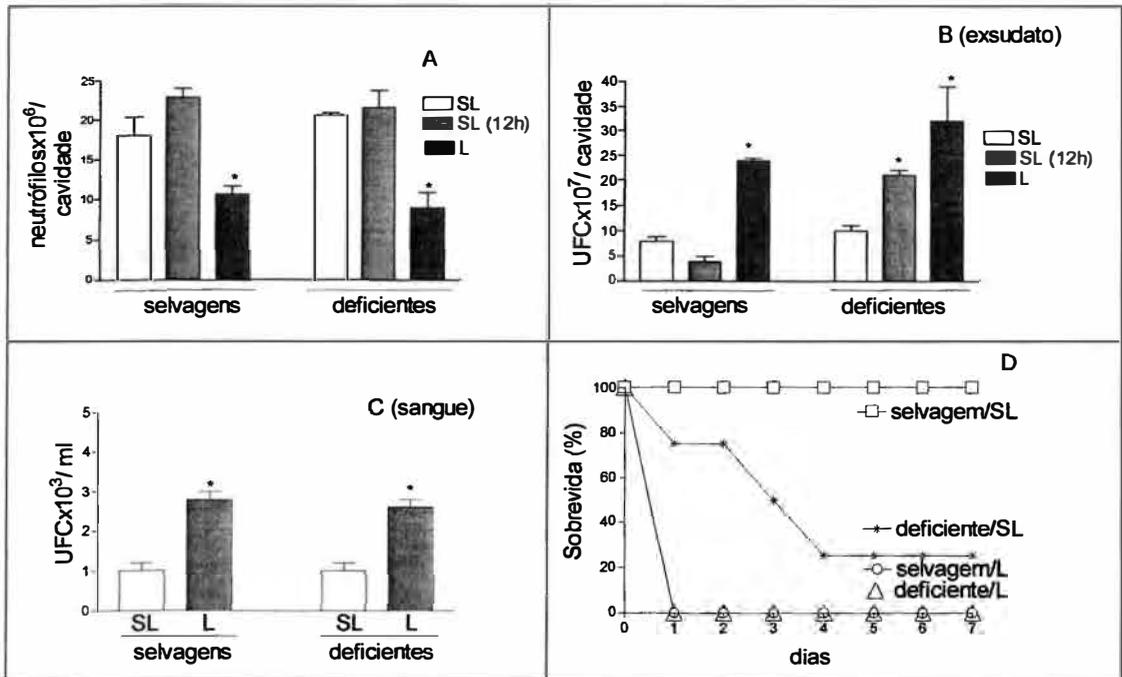


Fig.4: Migração de neutrófilos, quantificação de bactérias no exsudato e sangue e sobrevivência de animais selvagens e deficientes para o receptor p55 de TNF após a administração de *S.aureus*. Camundongos selvagens e deficientes para o receptor p55 de TNF receberam inóculos subletal (SL) ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) e letal (L) (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.). (A) Quatro horas (SL ou L) ou 12h (SL 12h) após a administração das bactérias a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi analisada. (B) Alíquotas de exsudato obtidas 4 horas (SL ou L) ou 12 horas (SL 12h) após a inoculação e foram semeadas e avaliadas após 24 h. (C) Alíquotas de sangue obtidas 4 horas (SL ou L) após a inoculação foram semeadas e avaliadas 24 h após. (D) Sobrevivência dos animais foi observada até 7 dias após a administração das bactérias. * $P < 0,01$ estatisticamente significativo em relação aos animais que receberam inóculo subletal (SL). Figura representativa de 2 experimentos. Cada grupo experimental possuía $n=4$. Resultados expressos como média \pm epm.

4.2.2 – Participação do IFN- γ

Apesar de não terem sido realizados experimentos para se quantificar IFN- γ no exsudato e sangue dos animais inoculados, optamos por estudar a participação do IFN- γ baseados em dados de literatura que sugerem a importância desta citocina na patogênese da sepse. Para tal utilizamos animais deficientes para a produção de IFN- γ , os quais foram inoculados com *S.aureus*.

Os animais selvagens e deficientes para a produção de IFN- γ , que receberam inóculo letal, apresentaram redução da migração dos neutrófilos (Fig.5A). O número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais que receberam inoculação subletal se manteve sempre maior do que aqueles que receberam inóculo letal, seja ela observada 4 ou 12 horas após a inoculação. A Fig.5B revelou que a maior quantidade de bactérias no exsudato de animais que receberam inóculo letal é semelhante para animais selvagens e deficientes. Além disto observamos que somente nos animais deficientes que receberam inoculação subletal e foram observados 12h após, apresentavam quantidade de bactérias maior em seu exsudato. A bacteremia dos animais que receberam inoculação letal (animais selvagens ou deficientes) é maior do que nos animais que receberam a inoculação subletal. Além disto, a bacteremia dos animais deficientes, que receberam inoculação letal, é maior do que aqueles selvagens que receberam o mesmo inóculo (Fig.5C). É interessante observar que os animais deficientes que receberam inóculo subletal, observados 12h após, não apresentavam bactérias no sangue. Em relação à sobrevivência dos animais, observamos que 100% dos animais selvagens e deficientes que receberam inóculo letal morreram em 24 horas. No grupo dos animais deficientes que receberam inóculo subletal, observamos 25% de sobrevivência, ao contrário do grupo de animais selvagens que receberam inóculo subletal que apresenta 100% (Fig.5D).

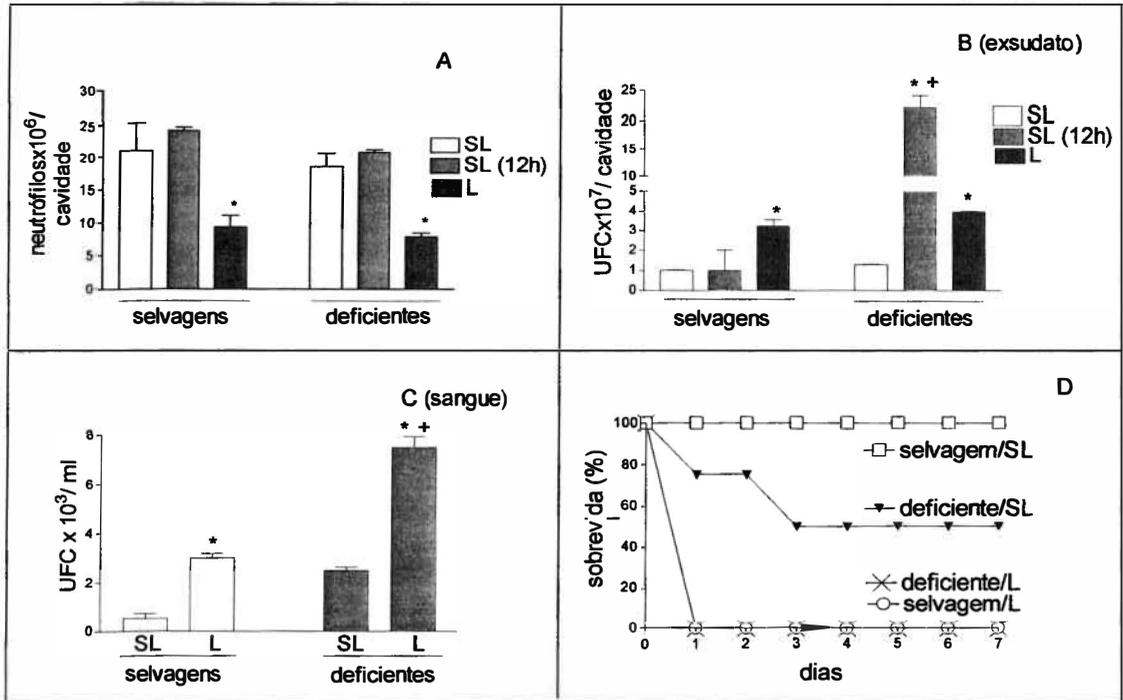


Fig. 5: Migração de neutrófilos, quantificação de bactérias no exsudato e sangue e sobrevivência de animais selvagens e deficientes para IFN- γ após a administração de *S.aureus*. Camundongos selvagens e deficientes para IFN- γ induzida receberam inóculos subletal (SL) ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) e letal (L) (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.). (A) Quatro horas (SL ou L) ou 12h (SL 12h) após a administração das bactérias a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi analisada; (B) alíquotas de exsudatos obtidas 4 horas (SL ou L) ou 12 horas (SL 12h) após a inoculação foram semeadas e as colônias foram avaliadas 24 horas após. (C) Alíquotas de sangue obtidas 4 horas (SL ou L) após a inoculação foram semeadas e as colônias foram avaliadas 24 h após. (D) Sobrevivência dos animais foi observada até 7 dias após a administração das bactérias. * $P < 0,05$ estatisticamente significativo em relação aos animais que receberam inóculo subletal. + $P < 0,05$ estatisticamente significantes em relação ao grupo dos animais selvagens que receberam inoculação letal (painéis B e C). No painel D, animais deficientes/SL é estatisticamente significativo aos animais selvagens/SL ($P < 0,05$), a partir do 3º dia. Figura representativa de 2 experimentos. Cada grupo experimental possuía $n=4$. Resultados expressos como média \pm epm.

4.2.3 – Participação do óxido nítrico

Objetivamos estudar outros mediadores envolvidos na redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, pois os dados apresentados anteriormente demonstraram que o TNF- α e IFN- γ , não participam deste fenômeno. Para tal, baseados em dados de literatura que demonstram que o óxido nítrico é um importante mediador envolvido na sepse, iniciou-se experimentos direcionados em analisar a participação deste mediador no presente modelo de sepse. Além da migração de neutrófilos, analisamos a sobrevivência dos animais e também a presença de bactérias no exsudato peritoneal e bacteremia.

4.2.3.1 - Efeito da administração de aminoguanidina

Animais pré-tratados com aminoguanidina, um inibidor seletivo da NO sintase induzida, nas doses de 10, 20 e 30 mg/Kg, 30 minutos antes da inoculação letal, foram avaliados quanto a sobrevivência, migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e presença de bactérias no exsudato e sangue. A Fig.6A representa a prevenção da redução da migração de neutrófilos em animais pré-tratados com aminoguanidina na dose de 30 mg/kg. As Figs.6B e C mostram a diminuição nas quantidades de bactérias presentes no exsudato e sangue dos animais pré-tratados com aminoguanidina na mesma dose que preveniu a redução da migração de neutrófilos (30 mg/Kg). Não observamos melhora na sobrevivência destes animais, apesar do pré-tratamento com aminoguanidina que preveniu a redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal associado a diminuição do número de bactérias no exsudato e sangue (Fig.6D). Doses de 10 e 20 mg/Kg de aminoguanidina, 30 minutos antes da inoculação letal também não protegeram os animais da morte.

Foi analisada também a capacidade fagocítica dos neutrófilos dos animais que receberam inóculo subletal, letal ou pré-tratados com aminoguanidina seguido de inóculo letal. Não foi observada nenhuma diferença entre os grupos experimentais (Tab. 3).

Pode-se então observar que não houve correlação entre a prevenção da redução da migração dos neutrófilos, observada após o tratamento com aminoguanidina e diminuição da taxa de mortalidade dos animais até o presente momento. Baseados no fato de que a meia-vida da aminoguanidina é de aproximadamente 2 h, outros esquemas

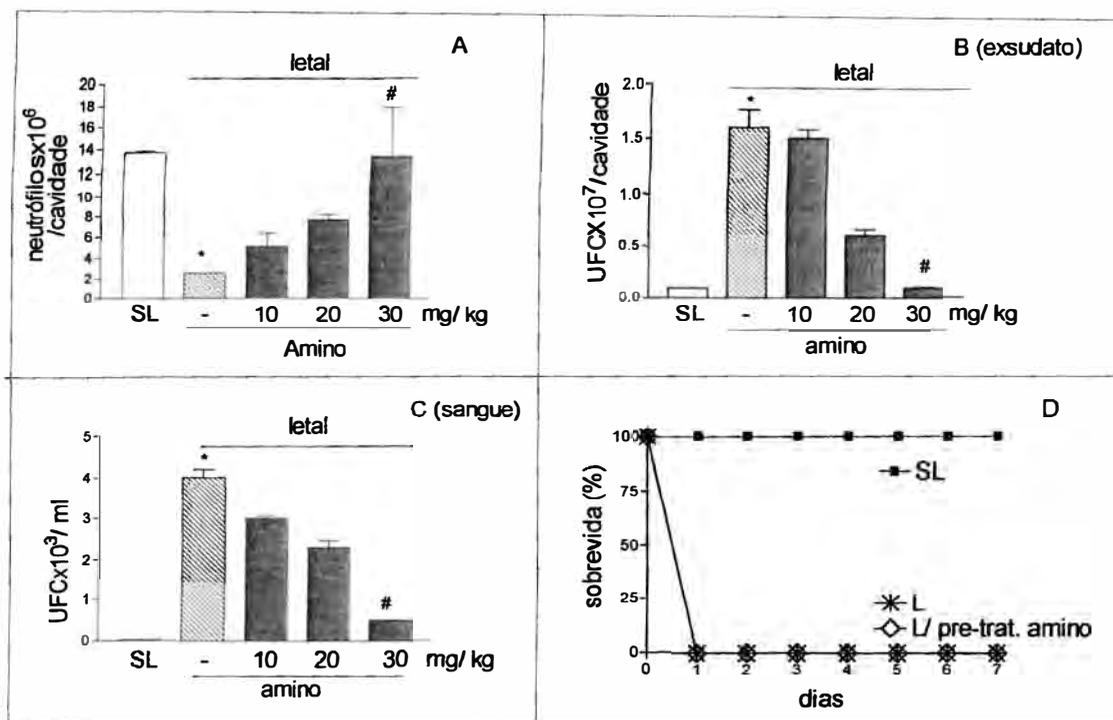


Fig. 6: Efeito da administração de diferentes doses de aminoguanidina na migração de neutrófilos, número de bactérias no exsudato e sangue e sobrevivência: Camundongos foram pré-tratados com aminoguanidina (amino) (10, 20 e 30 mg/Kg; s.c.) 30 min. antes da administração de bactérias nos inóculos subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p) e letal (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p). Quatro horas após a administração das bactérias os diferentes parâmetros foram analisados. **A:** Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi analisada. **B:** Alíquota de exsudato foi semeada e as colônias foram avaliadas 24 h após. **C:** Alíquotas de sangue foram semeadas e as colônias foram avaliadas 24 h após. **D:** Sobrevivência dos animais normais e não pré-tratados com aminoguanidina foi observada até o sétimo dia da administração das bactérias. * $P < 0,01$ estatisticamente significante em relação aos animais que receberam inóculo subletal. # $P < 0,05$ estatisticamente significante ao grupo letal não pré-tratado com aminoguanidina. Figura representativa de 3 experimentos. Cada grupo experimental possuía $n=4$. Resultados expressos como média \pm epm

Tab.3: Capacidade fagocítica dos neutrófilos de animais que receberam inóculo subletal, letal e de animais tratados com aminoguanidina e deficientes da NOSi.

Grupos experimentais	fagocitose¹ (%)
Subletal	35 – 40
Letal	90
Amino+Letal	90 – 100
Deficiente NOSi	95

¹Fagocitose= neutrófilo que apresentava 5 ou mais bactérias em seu citoplasma

Animais receberam inóculo subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) ou inóculo letal (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ , i.p) ou foram pré-tratados com aminoguanidina (30 mg/ Kg, 30 minutos antes do inóculo letal) (amino+letal); ou foram utilizados animais deficientes para NOS induzida (deficientes NOSi) que receberam inóculo letal. Análise da fagocitose dos neutrófilos dos diferentes grupos experimentais foi avaliada 4 horas após as inoculações. Figura representativa de 2 experimentos independentes. Cada experimento possuía n=4.

de tratamentos foram avaliados no sentido de se tentar manter o nível plasmático da droga e aumentar a sobrevida dos animais.

4.2.3.2 – Análise dos diferentes parâmetros 12h após o pré-tratamento com aminoguanidina.

A Fig.7A mostrou que a prevenção da redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos que receberam somente uma dose de aminoguanidina, observada 4 horas após a administração das bactérias, não é mantida quando é observada após 12 horas. Por outro lado, quando os animais são pré-tratados com aminoguanidina (30mg/ Kg), 30 minutos antes da inoculação letal e recebem um segundo tratamento na dose de 5mg/Kg, 6 horas após a administração das bactérias, observamos que a prevenção da redução da migração de neutrófilos é mantida, 12 horas após a inoculação.

A quantidade de bactérias presentes no exsudato de ambos os grupos pré-tratados com aminoguanidina, 4 ou 12 horas após inoculação letal é menor do que o grupo que recebeu somente bactérias no inóculo letal. (Fig.7B)

Por outro lado, 12 horas após o inóculo, a presença de bactérias no sangue do grupo que recebeu somente uma dose de aminoguanidina é igual ao grupo letal. Quanto ao grupo que recebeu duas doses de aminoguanidina, a bacteremia é drasticamente menor, quando comparado com os grupos letal e pré-tratado somente uma vez com aminoguanidina (Fig.7C).

A sobrevida dos diferentes grupos experimentais foi representada na Fig.7D. A taxa de sobrevida do grupo que recebeu duas doses de aminoguanidina permaneceu em 30% após 24 horas da inoculação letal. Os grupos letal e pré-tratado com aminoguanidina somente uma vez apresentaram 100% de mortalidade em 24 horas.

Finalmente, demonstramos que a prevenção da redução na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos que recebeu *S.aureus* é mediada pelo NO. Além disto, esta reversão da migração de neutrófilos está correlacionada com a proteção apenas parcial do animal quanto a morte.

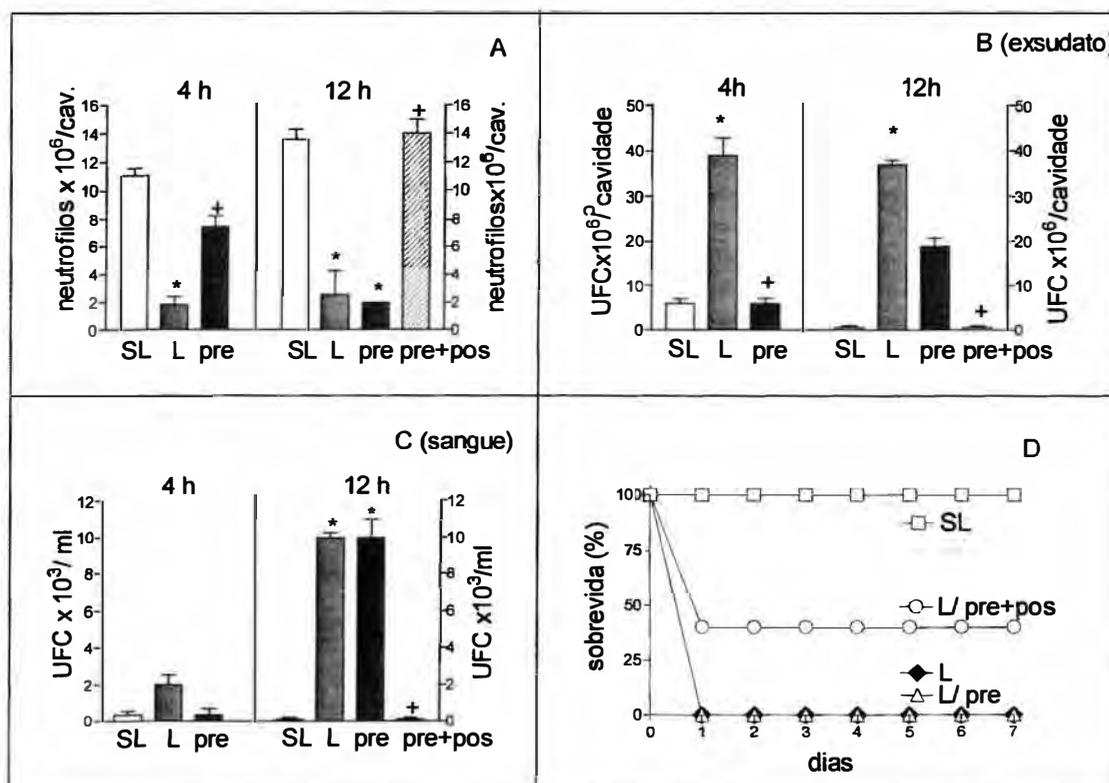


Fig.7: Análise dos diferentes parâmetros 12 horas após tratamentos com aminoguanidina. Camundongos foram pré-tratados com aminoguanidina: 30 mg/Kg, s.c., 30 min. antes do inóculo letal de bactérias (pré) ou 30 mg/Kg, s.c., 30 minutos antes da inoculação letal e 5 mg/Kg, 6 horas após a administração das bactérias (pré+pos). **A:** Migração de neutrófilos foi avaliada 4 e 12 horas após a administração das bactérias. **B:** Aliquota de exsudato foi semeada e as colônias foram avaliadas 24 h após. **C:** Aliquotas de sangue foram semeadas e as colônias foram avaliadas 24 h após. **D:** Sobrevida dos animais foi observada até o sétimo dia da administração das bactérias após os seguintes tratamentos: inoculação subletal (SL); letal (L); pré-tratados com aminoguanidina 30 mg/Kg 30 min. antes da inoculação letal (pre); ou pré-tratados com 30 mg/Kg e pós-tratados com 5 mg/kg 6 horas após inoculação letal (pré + pos). * $P < 0,001$ estatisticamente significativo em relação aos animais que receberam inóculo subletal. + $P < 0,05$ estatisticamente significativo ao grupo que recebeu somente uma dose de aminoguanidina. Figura representativa de 2 experimentos. Cada grupo experimental possuía $n=4$. Resultados expressos como média \pm epm.

4.2.3.3 – Efeito de diferentes tratamentos de aminoguanidina sobre a inoculação subletal

Até o momento, nosso estudo demonstrou que a reversão da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal é mediada pelo NO. Por outro lado, a migração destas células protege parcialmente os animais da morte. Além disto está descrito em literatura que o NO apresenta um importante papel microbicida. Assim, os próximos experimentos têm como objetivo analisar o possível papel microbicida do NO no presente modelo de sepse.

Animais que receberam inóculo subletal foram submetidos aos seguintes tratamentos com aminoguanidina: 1 – pré-tratamento com aminoguanidina, 30 minutos antes da administração do inóculo subletal de bactérias; 2 – pré-tratamento com aminoguanidina, 30 minutos antes da administração das bactérias, no inóculo subletal e um segundo tratamento com aminoguanidina (na mesma dose) 2 horas, após a injeção de bactérias. A Fig.8A mostrou que, independente do tipo de tratamento com aminoguanidina, não houve efeito sobre a migração de neutrófilos. Por outro lado, as Figs.8B e C demonstraram que a medida que se aumenta o número de tratamentos com aminoguanidina, a quantidade de bactérias presentes no exsudato peritoneal e sangue é maior. Quanto à sobrevida, observamos na Fig.8D que somente o pré-tratamento com aminoguanidina não alterou a sobrevida dos animais, mantendo-se igual aos animais que receberam somente as bactérias. Por outro lado, no grupo em que os animais receberam duas doses de aminoguanidina (30 minutos antes da inoculação subletal e 2 horas após a inoculação), a sobrevida piorou em 50%.

4.2.3.4 - Efeito de N- ω -nitro-L-arginina

Quando pré-tratamos os animais, 30 minutos antes da inóculo letal de bactérias, com N- ω -nitro-L-arginina, um inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico, não observamos reversão da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (Fig.9), como também não houve melhora da sobrevida (dados não mostrados). Os dados do pré-tratamento com aminoguanidina foram apresentados para comparação.

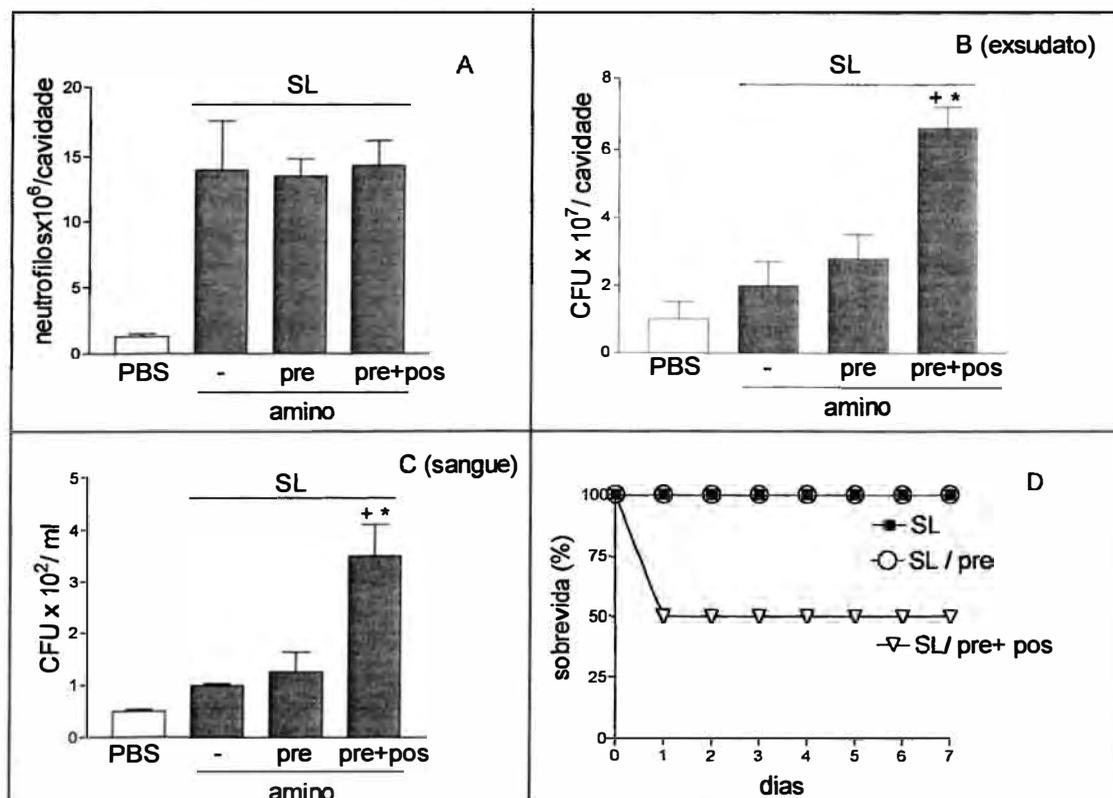


Fig.8: Efeito de diferentes tratamentos com aminoguanidina em animais que receberam inoculação subletal. Animais receberam aminoguanidina (30 mg/Kg, s.c.) (pré), 30 minutos antes da inoculação subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.); ou 30 mg/kg, s.c., 30 minutos antes da inoculação e 2 h após a administração do inóculo subletal (pre+pos). Quatro horas após a administração das bactérias, os diferentes parâmetros foram analisados. **A:** Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi analisada. **B:** Aliquota de exsudato foi semeada e colônias foram avaliadas após 24 h. **C:** Aliquotas de sangue foram semeadas e as colônias foram avaliadas 24 h após. **D:** Sobrevida dos animais que receberam diferentes inoculações e pré-tratamentos foi observada até o sétimo dia da administração das bactérias. * $P < 0,05$ estatisticamente significativo em relação aos animais que foram pré-tratados com aminoguanidina (pré). + $P < 0,05$ estatisticamente significativo ao grupo que recebeu somente uma dose de aminoguanidina (pre). No painel D grupo que recebeu duas doses de aminoguanidina (pre+pos) é estatisticamente significativo ao grupo que recebeu somente uma dose (pre) ($P < 0,05$). Figura representativa de 2 experimentos. Cada grupo experimental possuía $n=5$. Resultados expressos como média \pm epm.

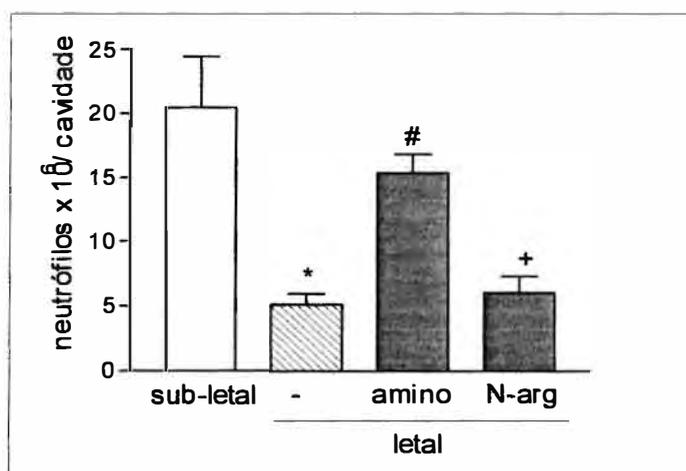


Fig. 9: Efeito de N- ω -nitro-L-arginina na migração de neutrófilos após a administração de *S.aureus*: Camundongos receberam inóculo subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) ou letal (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.), além de serem pré-tratados com N ω -nitro-L-arginina (N-arg) (30 mg/ Kg; s.c.) ou aminoguanidina (30 mg/Kg; s.c.) 30 min. antes receberam inóculo letal . * P< 0,001 estatisticamente significante em relação aos animais que receberam inóculo subletal. + P<0,01 estatisticamente significante aos grupos que receberam inóculo letal pré-tratados com aminoguanidina.# P <0,001 estatisticamente significante em relação ao grupo que recebeu inóculo letal. Figura representativa de 2 experimentos. Cada grupo experimental possuía n=5. Resultados expressos como média \pm epm

4.2.3.5 - Animais deficientes da enzima NOSi.

A Fig.10A mostra que não houve prevenção da redução da migração neutrofílica para o foco infeccioso nos animais deficientes que receberam inóculo letal. O recrutamento de neutrófilos é o mesmo tanto no animal selvagem, quanto no animal deficiente que receberam inóculo subletal, quando observados 4 ou 12 horas após a inoculação. A maior quantidade de bactérias no exsudato de animais que receberam inóculo letal é semelhante para animais selvagens e deficientes (Fig.10B). Além disto observamos que somente nos animais deficientes que receberam inoculação subletal e foram observados 12h após, apresentavam quantidade de bactérias maior em seu exsudato, a níveis semelhantes a animais observados 4 horas após e que receberam inoculação letal. A bacteremia dos animais que receberam inoculação letal (animais selvagens ou deficientes) é maior do que nos animais que receberam a inoculação subletal (selvagens ou deficientes). Além disto, a bacteremia dos animais deficientes, que receberam inoculação letal, é três vezes maior do que aqueles selvagens que receberam o mesmo inóculo (Fig.10C). É interessante observar que os animais deficientes que receberam inóculo subletal, avaliados 12h após, não apresentavam bactérias no sangue. A porcentagem de sobrevivência dos animais deficientes que receberam inóculo subletal é de 70 %, enquanto que para os animais selvagens, que receberam este mesmo inóculo, todos os animais sobreviveram no período de 7 dias. O inóculo letal em animais deficientes leva a morte 30% dos animais, 2 horas após a administração das bactérias, em 6 horas mais 30% destes animais foram a óbito e o restante morreu em 24 horas (Fig.10D). Analisando a capacidade fagocítica dos neutrófilos dos animais selvagens e deficientes seguido da inoculação letal, não foi observada diferenças significativas entre os grupos (ver Tab.3).

4.2.3.6 – Efeito da D-penicilamina

D-penicilamina, droga com afinidade ao NO, retirando esta molécula do meio (Joyce et al., 1988), foi utilizada com o objetivo de se confirmar a participação do NO na redução da migração de neutrófilos para o foco inflamatório (fig.11). Na Fig.11A está representada a prevenção da redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais pré-tratados com D-penicilamina somente na dose de 40 mg/kg.

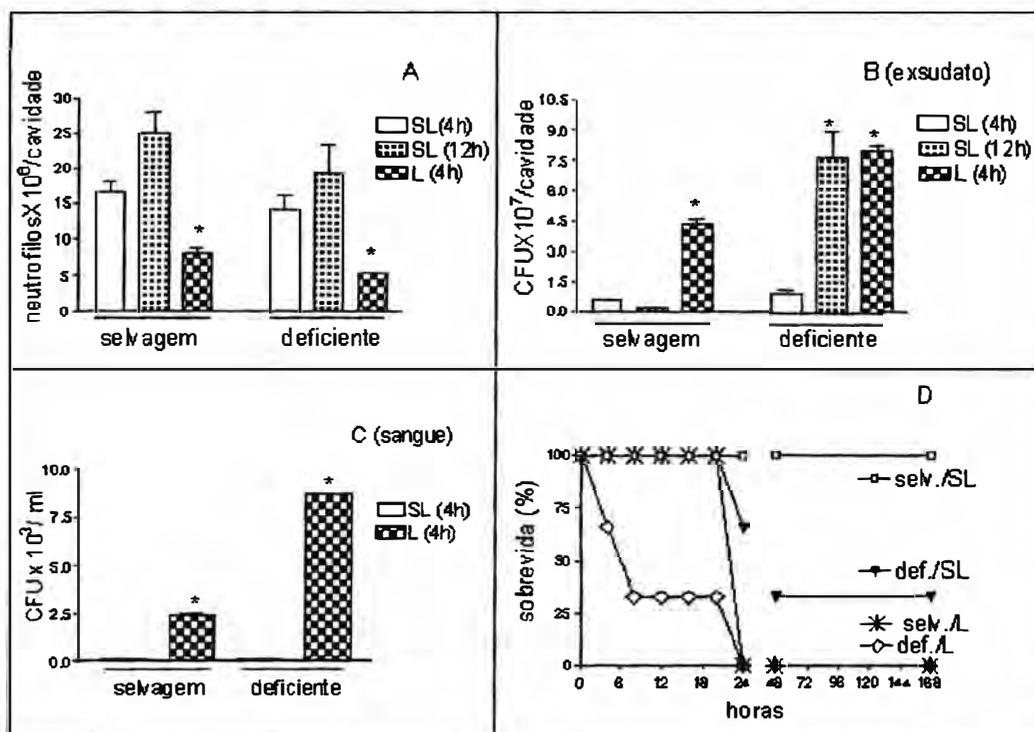


Fig. 10: Migração de neutrófilos e quantificação de bactérias no exsudato e sangue de animais selvagens e deficientes para a enzima NO sintase induzida após a administração de *S.aureus*. Camundongos selvagens e deficientes para NO sintase induzida receberam inóculos subletal (SL) ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) e letal (L) (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.). Os diferentes parâmetros foram analisados 4 horas (SL ou L) ou 12h (SL 12h) após a administração das bactérias. (A) A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi analisada; (B) Aliquotas de exsudatos obtidas 4 horas (SL ou L) ou 12 horas (SL 12h) após a inoculação foram semeadas e as colônias foram avaliadas 24 h após; (C) Aliquotas de sangue obtidas 4 horas (SL ou L) após a inoculação foram semeadas e o número de colônias foi avaliado 24 h após. (D) sobrevivida dos animais foi observada até 7 dias após a administração das bactérias. * $P < 0,01$ estatisticamente significativa em relação aos animais que receberam inóculo subletal. Figura representativa de 2 experimentos. No painel D grupo dos animais deficientes que receberam dose subletal é estatisticamente significativa aos animais selvagens que receberam mesmo inóculo ($P < 0,05$). Cada grupo experimental possuía $n=4$. Resultados expressos como média \pm epm..

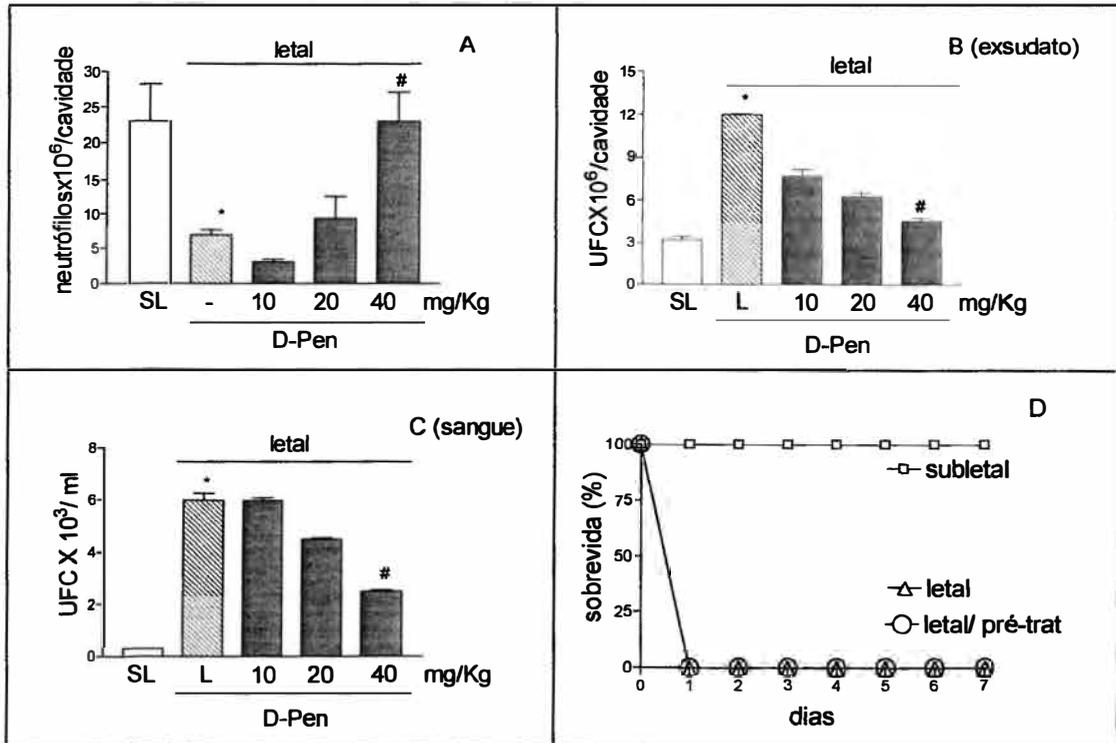


Fig. 11: Efeito de diferentes doses de D-penicilamina na migração de neutrófilos, número de bactérias no exsudato e sangue e sobrevivência após a administração de *S.aureus*: Camundongos receberam inóculo subletal (SL) ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) ou letal (L) (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.), além de serem pré-tratados com D-penicilamina (10, 20 e 40 mg/Kg; i.v.) 30 min. antes de receberem inóculo letal. Quatro horas após a inoculação diferentes parâmetros foram analisados. **A:** A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi analisada. **B:** Aliquota de exsudato foi semeada e o número de colônias foi avaliado 24h após. **C:** Aliquotas de sangue foram semeadas e o número de colônias foi avaliado 24h após. **D:** Sobrevivência dos animais normais e pré-tratados com D-penicilamina foi observada até o sétimo dia da administração das bactérias. * $P < 0,001$ estatisticamente significativa em relação aos animais que receberam inóculo subletal. # $P < 0,001$ estatisticamente significativa aos grupos que receberam inóculo letal não pré-tratados com D-penicilamina. Figura representativa de 2 experimentos independentes. Cada grupo experimental possuía $n=4$. Resultados expressos como média \pm epm.

As Fig.11B e C mostram que D-Penicilamina (40 mg/Kg) promoveu diminuição, estatisticamente significativa, na quantidade de bactérias presentes no exsudato e sangue. Entretanto, a D-penicilamina nas três doses utilizadas (10, 20 e 40 mg/Kg) não promoveu aumento das taxas de sobrevivência nos animais (Fig.11D).

Demonstramos então que o pré-tratamento com D-penicilamina previne a redução da migração dos neutrófilos, mas esta prevenção não está correlacionada com a proteção dos animais da morte. Assim, um número maior de experimentos deverá ser realizado para se esclarecer esta disparidade, considerando-se a meia-vida da droga e tempo de observação do fenômeno, assim como foi feito com a aminoguanidina. Finalmente, o fato que vem de encontro com os resultados obtidos com a aminoguanidina é que se mantivermos o número de neutrófilos na cavidade, estas células controlam o número de bactérias na cavidade peritoneal, impedindo que cheguem até à corrente sanguínea.

4.2.3.7 - Óxido nítrico e migração *in vitro* de neutrófilos

A capacidade de migração *in vitro* dos neutrófilos provenientes de animais que receberam inóculos subletal, letal ou foram pré-tratados com aminoguanidina 30 antes do inóculo letal foi analisada utilizando-se microcâmara de quimiotaxia. Utilizamos como estímulo migratório fMLP e LTB₄. Observamos que neutrófilos provenientes de animais que receberam inóculo letal apresentam menor capacidade de migração, quando comparamos neutrófilos provenientes de animais controle (injetados com PBS) ou que receberam inóculo subletal (dados estatisticamente significantes). Esta menor capacidade de migração é observada em todos os estímulos migratórios (fMLP ou LTB₄) ou ainda, no grupo, cujo estímulo migratório está ausente (RPMI). Os neutrófilos provenientes de animais que foram pré-tratados com aminoguanidina mantiveram preservada sua capacidade de migração, pois o número de células que migraram é maior do que aquelas células provenientes de animais que receberam inóculo letal, mas não foram pré-tratados. Esta prevenção da menor capacidade de migração foi observada nos dois diferentes estímulos migratórios (fMLP e LTB₄) ou no grupo sem estímulo (RPMI). Como controle utilizamos neutrófilos de animais que receberam somente PBS (Fig.12).

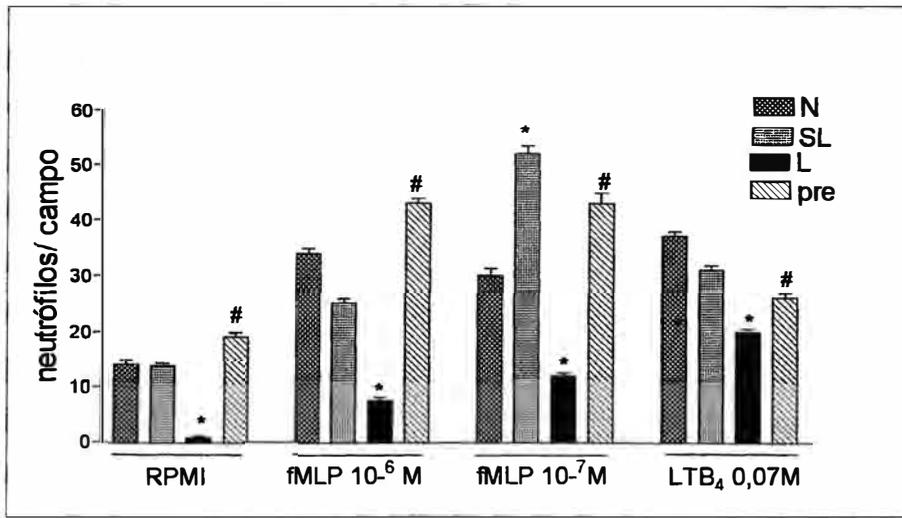


Fig. 12: Migração *in vitro* de neutrófilos provenientes de animais que receberam inóculo subletal, letal, ou letal pré-tratados com aminoguanidina. Neutrófilos periféricos foram obtidos de animais normais (N) ou que receberam inóculo subletal (SL) ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) ou letal (L) (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) ou pré-tratados com aminoguanidina (30 mg/Kg, s.c., 30 min. antes do inóculo letal) (pre). 5×10^4 neutrófilos/ poço foram colocados em microcâmara para o ensaio de migração *in vitro* (ver métodos). fMLP em diferentes concentrações (10^{-6} e 10^{-7} μ M) e LTB₄ (0,07M) foram utilizados como estímulo migratório para os neutrófilos dos diferentes grupos. * P < 0,001 estatisticamente significante em relação aos neutrófilos provenientes de animais que receberam inóculo subletal. # P < 0,001 estatisticamente significante ao grupo que recebeu inóculo letal sem pré-tratamento com aminoguanidina. Resultados expressos como média \pm epm. Figura representativa de 2 experimentos independentes. Cada grupo experimental possuía n=8.

4.3 – Participação das células residentes como fonte de mediadores envolvidos na redução da migração de neutrófilos

4.3.1 - Efeito do aumento do número de macrófagos

Para se aumentar o número de macrófagos residentes na cavidade peritoneal, os animais foram pré-tratados com tioglicolato, 72 h antes da administração das bactérias. Observamos aumento da população de macrófagos peritoneais de 7 vezes, enquanto que o número de neutrófilos é igual em ambos os grupos (Fig.13A). Após o tratamento com tioglicolato, os animais receberam inóculos subletal e letal e foram avaliados quanto à migração de neutrófilos, presença de bactérias no exsudato e sangue e sobrevida. Observamos que nenhum dos animais pré-tratados com tioglicolato morreram, assim como houve prevenção da redução da migração de neutrófilos (Fig.13B e E). Observamos também menores quantidades de bactérias no exsudato e sangue dos animais pré-tratados com tioglicolato, quando comparados com os animais que só receberam inóculo letal de bactérias (Fig.13C e 13D)

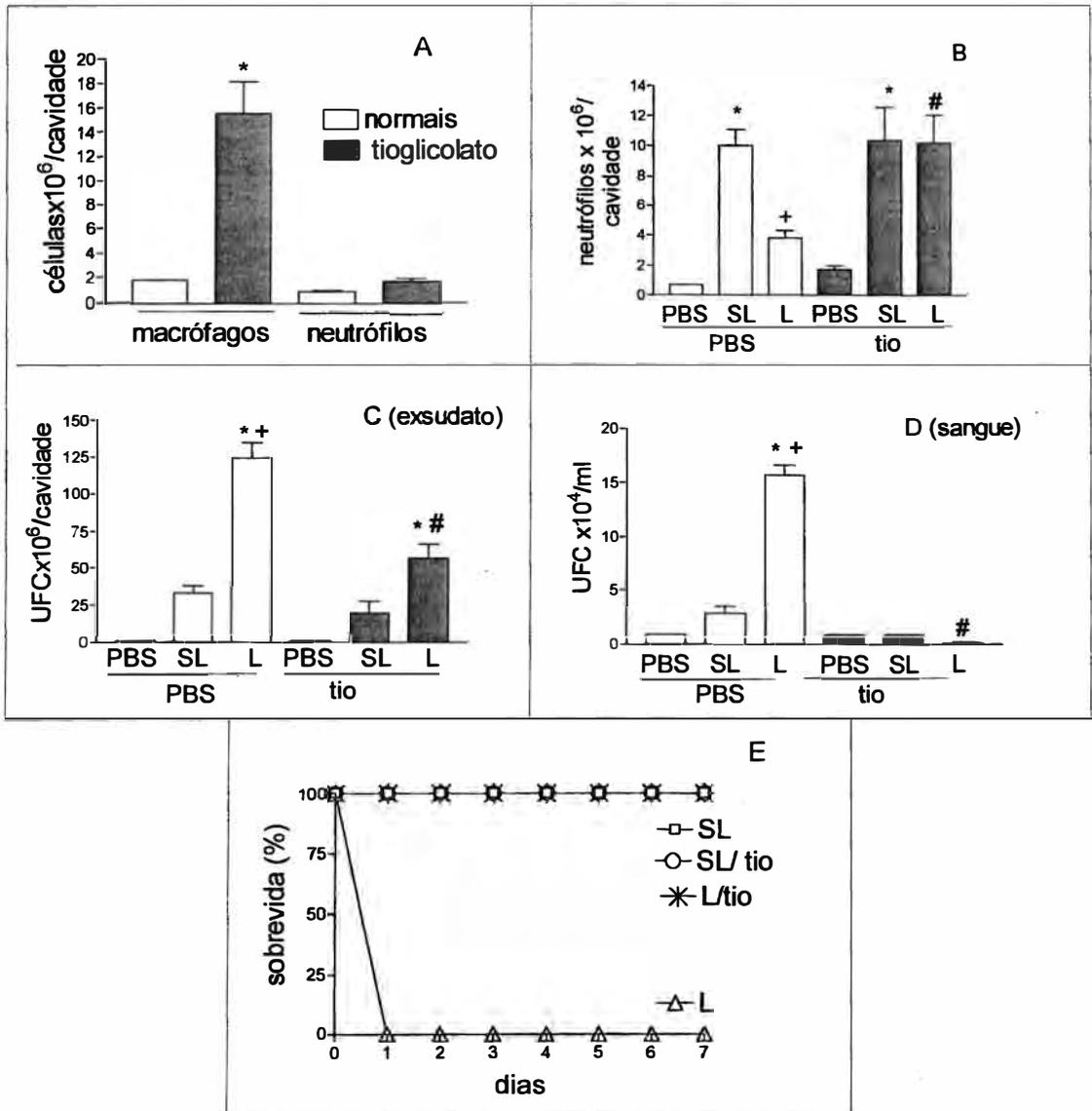


Fig. 13: Efeito do pré-tratamento de tioglicolato na migração de neutrófilos, número de bactérias no exsudato e sangue e sobrevida após a administração de *S.aureus*. Animais foram pré-tratados com tioglicolato (3 ml/ cavidade, 72 h antes da inoculação). Após o pré-tratamento receberam inóculos subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ , i.p.) e letal (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.). Quatro horas a inoculação, diferentes parâmetros foram analisados **A**: População de macrófagos e neutrófilos residentes na cavidade peritoneal de camundongos que receberam PBS e pré-tratados com tioglicolato. **B**: Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. **C**: Alíquota de exsudato foi semeada e as colônias foram avaliadas 24 h após. **D**: Alíquotas de sangue foram semeadas e o número de colônias foi analisado 24 h após. **E**: Sobrevida dos animais normais e pré-tratados com tioglicolato foi observada até o sétimo dia da administração das bactérias. * $P < 0,001$ estatisticamente significativo em relação aos animais que receberam PBS. + $P < 0,05$ estatisticamente significativo aos grupos que receberam inóculo subletal. # $P < 0,05$ estatisticamente significativo quando comparados animais com inóculo letal e sem pré-tratamento com tioglicolato. Figura representativa de 2 experimentos. Cada grupo experimental possuía $n=5$. Resultados expressos como média \pm epm

4.3.2 - Efeito da depleção de mastócitos

4.3.2.1 - Pré-tratamento com água destilada.

É descrito em literatura que a administração de água destilada em animais, induz a depleção de mastócitos (Mendonça, 1986). Desta maneira, esta ferramenta experimental foi utilizada para se estudar a participação dos mastócitos como fonte de mediadores envolvidos na redução da migração de neutrófilos. Para tanto, animais foram pré-tratados com 2 ml de água destilada 48 h antes da administração das bactérias (Fig.14). A Fig.14A mostra uma diminuição de 75% da população de mastócitos em cavidades que receberam este tratamento, em comparação às cavidades normais. Entretanto o número de neutrófilos permanece o mesmo após este pré-tratamento. Este procedimento preveniu a redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos além de diminuir o número de bactérias no exsudato e sangue de animais que receberam inóculo letal (Fig 14B, C e D). Finalmente, observou-se melhora de 33% na sobrevivência dos animais que foram pré-tratados com água em comparação com o grupo que não recebeu água (Fig.14E).

4.3.2.2 – Efeito do pré-tratamento com composto 48/80

Os Animais foram pré-tratados com composto 48/80, substância capaz de depletar e induzir a desgranulação de mastócitos (Di Rosa, 1971) (ver métodos). Após este pré-tratamento os animais receberam inoculação subletal e letal (Fig.15). A Fig.15A demonstra diminuição de mastócitos, estatisticamente significativa nos grupos pré-tratados com o composto 48/80, embora não tenha interferido no número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais. Este pré-tratamento preveniu a redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, além de diminuir o número de bactérias no exsudato e sangue de animais que receberam inóculo letal (Fig.15B, C e D). Finalmente, não observamos morte de nenhum dos animais que foram pré-tratados com 48/80 em comparação com o grupo letal que não recebeu 48/80 (Fig.15E).

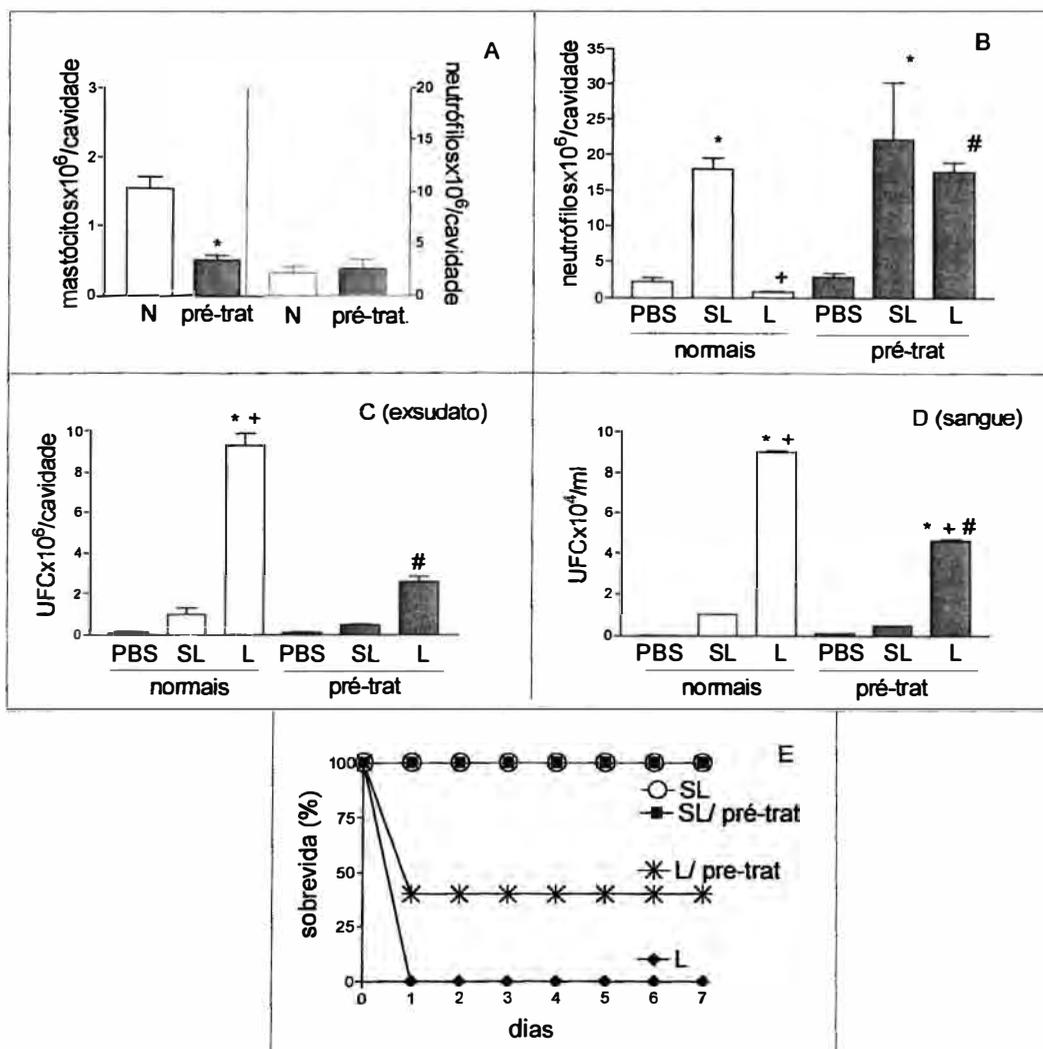


Fig.14: Efeito da depleção de mastócitos na migração de neutrófilos e número de bactérias no exsudato e sangue e sobrevida após a administração de *S. aureus*. Animais foram pré-tratados com água destilada (3 ml/ cavidade, 48 h antes das inoculações). Após o pré-tratamento com água, os animais receberam inóculos subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) (SL) e letal (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.) (L). Após 4 h os diferentes parâmetros foram analisados. **A:** População de células residentes totais presentes na cavidade peritoneal de camundongos que receberam PBS e pré-tratados. **B:** Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. **C:** Aliquota de exsudato foi semeada e avaliada 24 h após. **D:** Aliquotas de sangue foram semeadas e as colônias foram avaliadas 24h após. **E:** Sobrevida dos animais dos diferentes grupos experimentais foi observada até o sétimo dia. * $P < 0,05$ estatisticamente significativo em relação aos animais que receberam PBS. + $P < 0,05$ estatisticamente significativo aos grupos que receberam inóculo subletal. # $P < 0,05$ estatisticamente significativo aos animais com inóculo letal sem pré-tratamento. Figura representativa de 2 experimentos. Cada grupo experimental possuía $n=5$. Resultados expressos como média \pm epm.

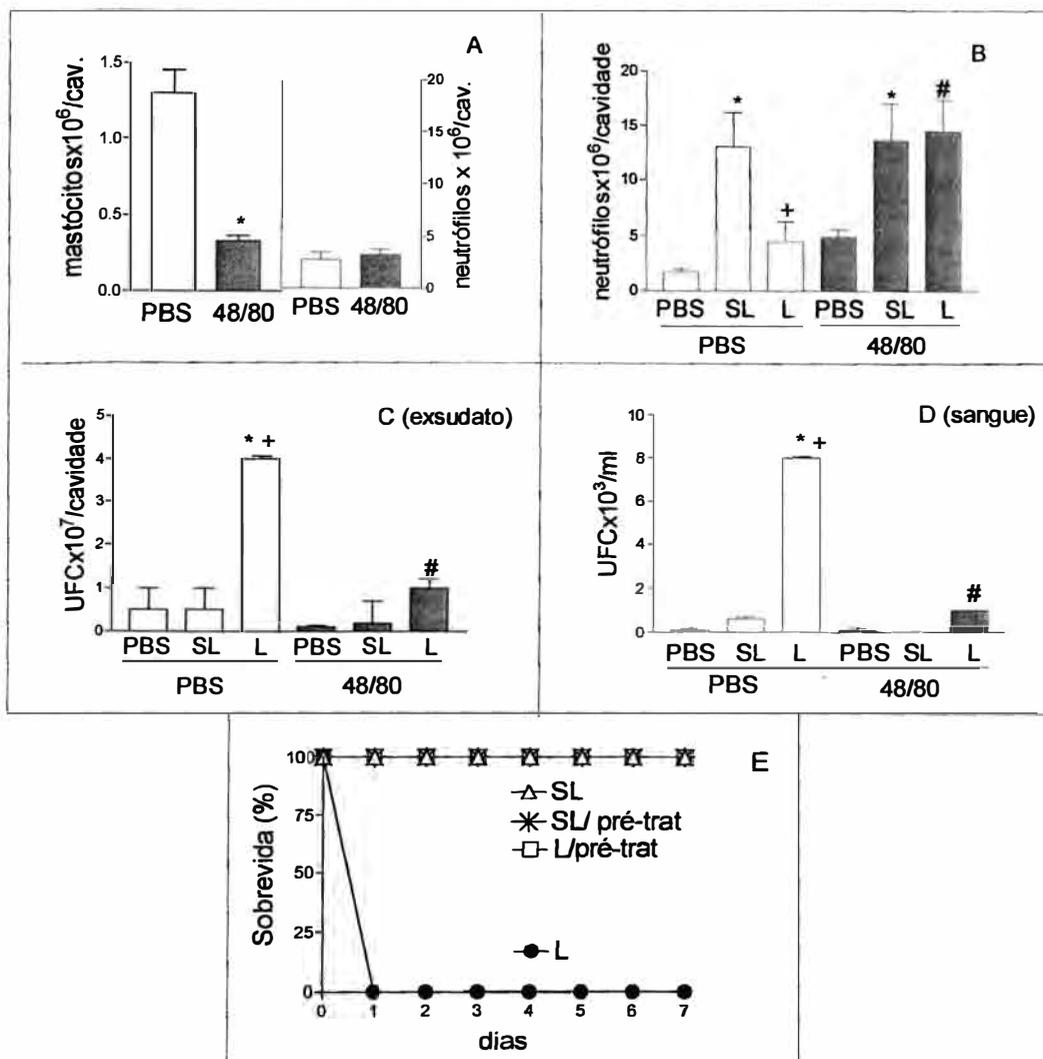


Fig.15: Efeito do pré-tratamento com composto 48/80 sobre a migração de neutrófilos, número de bactérias no exsudato e sangue e sobrevida após a administração de *S.aureus*. Animais foram pré-tratados com composto 48/80 (ver material e métodos). Após o pré-tratamento os animais receberam inóculos subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/cavidade/500 μ l, i.p) e letal (16×10^9 UFC/ cavidade/ 500 μ l, i.p.), após 4 h os diferentes parâmetros foram analisados. **A:** População de mastócitos e neutrófilos presentes na cavidade peritoneal de camundongos normais e pré-tratados com 48/80. **B:** Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. **C:** Aliquotas de exsudato foram semeadas e as colônias foram avaliadas 24h após. **D** Aliquotas de sangue foram semeadas e as colônias foram avaliadas 24 h após. **E:** Sobrevida dos animais normais e pré-tratados com água foi observada até o sétimo dia da administração das bactérias. * $P < 0,05$ estatisticamente significativo em relação aos animais que receberam PBS. + $P < 0,05$ estatisticamente significativo aos grupos que receberam inóculo subletal. # $P < 0,05$ estatisticamente significativo aos animais com inóculo letal e pré-tratados com 48/80. Figura representativa de 2 experimentos independentes. Cada grupo experimental possuía $n=4$. Resultados expressos como média \pm epm

5 – Discussão

Sepse tem sido hoje uma das maiores causas de morte de pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva, cuja incidência de óbito pode variar de 35 a 45% (Friedman et al, 1998). Há duas décadas a porcentagem de sepse induzida por bactérias Gram-negativas era maior do que aquelas provocadas por bactérias Gram-positivas, por consequência, até hoje dados obtidos de modelos experimentais em sepse são decorrentes da utilização de bactérias Gram-negativas e/ou LPS. Assume-se, atualmente, que a patogênese da sepse induzida por bactérias Gram-positivas seja igual àquelas induzidas por Gram-negativas (Opal & Cohen, 1999; Sriskandan & Cohen, 1999). Além disto, a mortalidade dos pacientes em choque séptico causado por bactérias Gram-positivas tem sido a mesma ou excedido a porcentagem de morte de pacientes em choque causado por Gram-negativas (Friedman, et al, 1998; Cohen, 2000; Tarkowski, 2000). As bactérias Gram-positivas que apresentam maior patogenicidade são: *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Sriskandan & Cohen, 1999). Torna-se então evidente a necessidade de se estudar os mecanismos e mediadores envolvidos na sepse induzida por esta bactéria.

Diante deste quadro, optamos pelo estudo da sepse induzida por *Staphylococcus aureus*, administrados vivos, por via intraperitoneal. Primeiramente, os animais foram inoculados com quantidades crescentes de bactérias (0,01; 0,08 e $0,5 \times 10^9$ UFC/cavidade) e observamos que era também crescente o número de morte destes animais, demonstrando, portanto que a porcentagem de morte era dependente da quantidade de bactérias administradas. Observamos também nestes grupos alguns sinais característicos desta doença como: piloereção, letargia, taquipnéia e secreção nos olhos, sinais estes que desapareciam 24 horas após as inoculações. Nos grupos, em que eram administradas maiores quantidades de bactérias (3 e 16×10^9 UFC/ cavidade), estes sinais culminavam na morte do animal 24 horas após as inoculações (Fig. 1).

No presente trabalho, o principal objetivo foi investigar se ocorre redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais em sepse que receberam *S.aureus* e qual a importância deste fenômeno na evolução da doença. Este objetivo foi baseado em dados de literatura, os quais demonstraram que o fenômeno da redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso foi observado no modelo de endotoxemia (Tavares-Murta et al., 1998), e no modelo de CLP em camundongos (Benjamim et

al.2000), sendo que, em ambos os modelos, foi correlacionada a falência da migração de neutrófilos com a piora do prognóstico dos animais.

Para tanto utilizamos diferentes inóculos de bactérias e observamos que o inóculo mais concentrado induziu redução na migração de neutrófilos (4×10^6 neutrófilos/cavidade), e levava à morte 100% dos animais (Fig.1). Este inóculo foi denominado de inóculo letal (16×10^9 UFC/cavidade). Outro inóculo de bactéria utilizado foi aquele capaz de induzir recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal (13×10^6 neutrófilos/cavidade) e que corresponde, ao mesmo tempo, à sobrevivência de todos os animais, denominado por sua vez de inóculo subletal ($0,5 \times 10^9$ UFC/cavidade). Fato interessante é que, após a inoculação letal, o número de neutrófilos permaneceu reduzido em todos os períodos observados, enquanto que, após a inoculação subletal, o número dos neutrófilos permaneceu elevado nos tempos estudados (Fig.2A). A idéia de que a presença do neutrófilo no foco infeccioso é de grande importância na resolução de algumas doenças foi demonstrada por Verdengh & Tarkowski, 1997. Neste estudo utilizaram como modelo experimental a administração i.v. de *S.aureus*. Assim, os animais que foram depletados de neutrófilos, pelo uso de anticorpo anti-neutrófilos, apresentavam maior taxa de mortalidade, além de frequência aumentada de artrite.

Em resumo, demonstramos que a redução da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal é crucial para o pior prognóstico da doença. Além disto, o conjunto dos resultados obtidos dos animais que receberam inóculo letal de bactérias até aqui apresentados, tais como: condições físicas (letargia, secreção nos olhos, taquipnéia) e bacteremia fornece-nos dados suficientes para caracterizar este quadro como modelo experimental de sepse induzida por *Staphylococcus aureus*.

Neutrófilos são células inflamatórias com grande potencial microbicida e são normalmente as primeiras células de defesa a atuarem contra diferentes patógenos. A sua habilidade de migrar rapidamente, para o sítio de infecção, é crucial para a eliminação eficiente de bactérias, parasitas e vírus. Além dos grânulos citoplasmáticos presentes no neutrófilo, este tipo celular possui ainda outro mecanismo microbicida de grande importância. Malawista, 1992 utilizou fragmentos anucleados de neutrófilos (*cytokineoplasts*) ausentes de grânulos ou mecanismos capazes de ativar o *burst* respiratório. Este autor sugeriu que a capacidade microbicida foi abolida pela adição de LNMMA, e esta mesma atividade foi restabelecida pelo excesso de L-arginina, demonstrando claramente que a produção de

NO tem papel microbicida importante neste tipo celular. Conlan, 1997 demonstrou a importância do neutrófilo para a eliminação sistêmica de outras bactérias patogênicas tais como: *Listeria monocytogenes* (Gram-positiva, intracelular facultativa); *Salmonella Typhimurium* (Gram-negativa, intracelular facultativa) e *Yersinia enterocolitica* (Gram-negativa extracelular).

Diante destes dados de literatura, passamos a correlacionar a presença do neutrófilo na cavidade peritoneal e a sua capacidade de eliminação do *S.aureus*. Observamos que os neutrófilos recrutados para a cavidade peritoneal nos animais que receberam inóculo subletal eliminaram de forma eficiente as bactérias presentes no exsudato peritoneal, impedindo assim a presença destas bactérias no sangue. Por outro lado nos animais que receberam o inóculo letal, os quais apresentaram menor número de neutrófilos recrutados, possuíam quantidades crescentes de bactérias no exsudato peritoneal e no sangue, quadro este que culmina na morte do animal 24 horas após (Fig.2B e C). Estes dados demonstram que a redução da migração do neutrófilos para o foco infeccioso é crucial para o controle local da infecção.

O leucograma dos animais que receberam ambos os inóculos foi analisado com o objetivo de verificar se a redução da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal é devido ao menor número deste tipo celular na corrente sanguínea. Observamos no grupo letal neutrofilia 2 e 4 horas após a inoculação (Tab.1). Desta maneira podemos descartar que a redução da migração dos neutrófilos para a cavidade seja atribuída à falência da medula óssea na produção de polimorfonucleares.

As alterações hemodinâmicas são características do quadro de sepse. O choque séptico é o agravamento da sepse, caracterizado por acentuadas alterações hemodinâmicas não responsivas à reposição de líquidos ou a agentes vasoconstritores (Crowley, 1996). Tornou-se então necessária avaliar a pressão arterial dos animais, para que a redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal não seja atribuída a mudanças hemodinâmicas. Após a canulação da artéria femural dos animais, as bactérias foram administradas e a pressão arterial foi monitorada 4 horas após. Alterações na pressão arterial não foram observadas, tanto nos animais que receberam inóculo subletal, quanto nos animais que receberam inóculo letal (Tab.2). Assim não podemos atribuir ao fato de que a redução da migração de neutrófilos se deva a mudanças hemodinâmicas graves, a ponto de comprometer a migração destas células para o foco infeccioso.

Se por um lado o neutrófilo é uma célula crucial para o controle local da infecção, por outro lado, a ativação descontrolada de neutrófilos pode causar dano tissular em algumas doenças inflamatórias, tais como injúria após isquemia e reperfusão, artrite, lupus eritematoso sistêmico e disfunção de múltiplos órgãos associada a trauma e sepse (Molinedo et al, 1999; Wagner & Roth, 1999). Na sepse a infiltração inapropriada deste tipo celular a órgãos vitais como pulmões, rins e fígado tem sido apontados como uma das principais causas da Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos, que acomete 30% dos pacientes, enquanto que quase todos desenvolvem disfunção de um órgão (Davies & Hagen, 1997). A literatura descreve que pacientes com a Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA), caracterizada por injúria pulmonar aguda, apresentam taxas de mortalidade de 40-70%, mesmo quando estes pacientes se encontram em Unidades de Terapia Intensiva (Ware & Matthay, 2000). A SARA foi também demonstrada em modelo experimental de sepse induzida por LPS e zimozan administrados intravenosamente. Demonstrou-se que esta Síndrome tem como causa principal o dano da membrana dos capilares e alvéolos decorrentes da adesão, ativação e recrutamento dos neutrófilos, os quais resultam em edema e impossibilidade de trocas gasosas (Nagase et al, 2000). Os mecanismos pelos quais os neutrófilos causam lesão ao endotélio vascular se devem à liberação de leucotrienos, PAF, proteases e acima de tudo devido aos metabólitos do óxido nítrico. Diante destas informações, realizamos estudo histopatológico de alguns órgãos vitais, avaliar se em nosso modelo experimental há lesão dos mesmos. Nos animais que receberam inóculo letal, observou-se edema pulmonar agudo e extensas áreas de infiltrados com células polimorfonucleares (prancha I, painel B), além de endotelite observada no fígado, com discreta infiltração de polimorfonucleares no espaço perivascular (prancha I, painel F). Portanto, a análise histopatológica é mais um dado que valida este modelo experimental como de sepse.

O próximo passo deste trabalho foi estudar os possíveis mediadores envolvidos neste fenômeno. Está bem estabelecido na literatura que dentre os mediadores inflamatórios envolvidos na sepse as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ), bem como as antiinflamatórias (IL-10, IL-4, TGF- β) possuem papel fundamental no desenvolvimento desta doença (Oberholzer et al, 2000). Dentre os mais variados papéis que as citocinas desempenham, pode-se destacar sua importância na migração de neutrófilos. Algumas citocinas, quando estão presentes no local da infecção, induzem a migração de neutrófilos para o local (Dinarello, 1997), mas um fato interessante é o de

que, quando estas citocinas estão na circulação, em altas concentrações, elas inibem a migração destas células para o foco infeccioso. Este fato foi demonstrado no modelo de endotoxemia, onde citocinas como TNF- α e IL-8 quando administradas intravenosamente inibem a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório, como o observado pela administração i.v. de LPS (Tavares-Murta, 1998). A partir destes dados foi proposto que este componente bacteriano atue por meio da liberação de citocinas na circulação (Schleiffenbaum et al, 1997). Portanto, procedeu-se com a quantificação de TNF, IL-1 e IL-10 presentes no exsudato peritoneal e sangue dos animais 4 horas após receberem inóculo subletal e letal. Os grupos subletal e letal apresentavam níveis aumentados destas citocinas tanto no soro quanto no exsudato peritoneal, sem que observássemos diferenças significativas entre os grupos.

Após a quantificação de citocinas dos animais em sepse, o objetivo seguinte foi avaliar a participação de TNF- α no fenômeno da redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Apesar de não se ter dosado o IFN- γ nos animais submetidos às inoculações, decidiu-se também estudar a participação desta citocina, devido a sua ampla participação em outros modelos experimentais de sepse (Zhao & Tarkowisk, 1995; Zhao et al., 1998). Para tanto, utilizamos animais deficientes do receptor p55 do TNF- α e animais deficientes na produção de IFN- γ . Para ambos os grupos, observamos que não houve prevenção da redução da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais que receberam inóculo letal, além disto o animal apresentou grandes quantidades de bactérias no exsudato peritoneal e sangue e finalmente a taxa de sobrevivência destes animais é idêntica aos animais selvagens que receberam o mesmo inóculo (Figs.4 e 5). Pode-se sugerir então que o TNF- α e IFN- γ não são mediadores importantes na redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Fato interessante é que os animais deficientes que receberam inóculo subletal apresentaram menores taxas de sobrevivência, quando comparados com os animais selvagens que receberam o mesmo inóculo. Este fato ocorre, apesar da migração neutrofílica ser de igual magnitude nos animais selvagens e deficientes quando observada 4 ou 12 horas após receberem inóculo subletal. Ainda foi nos animais deficientes (TNF- α e IFN- γ) foi observado um aumento significativo de bactérias presentes no exsudato, 12 horas após a inoculação subletal, sugerindo que estes animais possuem menor capacidade microbicida. É importante observar que estes animais não

apresentavam bacteremia, a este fato atribuímos ao tempo de observação dos animais, talvez 12 horas após a inoculação não seja tempo suficiente para as bactérias atingirem a corrente sanguínea. Dados de literatura tem demonstrado a importância do TNF- α e IFN- γ como mediadores envolvidos na morte (*killling*) do *S.aureus*. Rainard et al, 2000 demonstraram que, neutrófilos previamente incubados com TNF- α , apresentavam sua capacidade de fagocitose, assim como sua capacidade bactericida contra o *S.aureus*, aumentados. Além disto, foi demonstrado que a atividade microbicida *in vitro* de neutrófilos humanos para *S.aureus* é potenciada na presença de IFN- γ (Edwards et al, 1988). Mais recentemente, através do modelo experimental de sepse e artrite induzida por *S.aureus* em animais geneticamente modificados (não apresentam o receptor para IFN- γ) Zhao & Tarkowisk, 1995 demonstraram aumento da mortalidade destes animais, acompanhada de maior bacteremia e presença de bactérias em órgãos parenquimatosos. Está, claramente estabelecido, na literatura, o envolvimento de algumas citocinas no papel microbicida de macrófagos e neutrófilos. TNF- α , IFN- γ e produtos bacterianos são potentes ativadores da enzima NOSi (Cunha et al., 1993). Uma vez liberado, o NO e seus metabólitos desempenham seu importante papel microbicida. Em resumo os dados de literatura corroboram com nossa demonstração experimental de que o IFN- γ e o TNF- α são importantes para a atividade bactericida dos neutrófilos. Assim, somente a presença do neutrófilo, no sítio da infecção, não é suficiente para a resolução da doença, devendo esta célula apresentar plena capacidade de eliminar o patógeno.

Atualmente está clara a participação do NO na sepse e no choque séptico. Ele é responsável pela maioria dos efeitos patológicos observados nesta síndrome (Stewart & Zhang, 1999). Na evolução da sepse citocinas liberadas durante o processo (como por exemplo TNF e IFN), agem em sinergismo com toxinas bacterianas e induzem a enzima NOSi, produzindo NO (Wolkow, 1998). Além disto em experimentos *in vivo* e *in vitro*, o NO inibe a adesão dos leucócitos às células endoteliais (Hickey et al., 1997). O envolvimento do NO na redução da migração de neutrófilos em diferentes modelos de sepse já foi anteriormente citado. Sucintamente, Tavares-Murta et al, 1998 utilizando modelo experimental de endotoxemia, demonstraram que o pré-tratamento dos animais com inibidor da NOS (L-NMMA), preveniu o efeito inibitório do TNF- α , IL-8 e do MNCF sobre o recrutamento de neutrófilos, sugerindo que a participação do NO nesse fenômeno. Além disto, no modelo experimental de CLP em camundongos, o pré-

tratamento destes animais com D-penicilamina e aminoguanidina (“scavenger” de NO e inibidor da NOS_i, respectivamente) previniu a redução da migração dos neutrófilos e melhora a sobrevida destes animais (Benjamim et al., 2000). Com base nestes resultados, investigamos se o NO, que provavelmente está sendo produzido e liberado durante a sepse induzida por *S.aureus*, estaria envolvido na falência da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal. Para tanto, utilizamos aminoguanidina, um inibidor seletivo da NOS_i (Griffiths et al., 1993) para analisar seus efeitos sobre a migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal, sobrevida e presença de bactérias no exsudato peritoneal e sangue. O animal pré-tratado com aminoguanidina, seguido da inoculação letal, não apresentou redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Associado a este fato foi observado diminuição do número de bactérias na cavidade peritoneal e no sangue destes animais (Fig.6). Estes dados sugerem que a redução da migração do neutrófilo para o foco infeccioso é mediada pelo óxido nítrico. Como consequência, a presença deste tipo celular controla a quantidade de bactérias na cavidade peritoneal, impedindo assim, que as bactérias entrem na corrente sanguínea. Fato interessante foi observado na sobrevida, pois o tratamento com aminoguanidina que preveniu a redução da migração dos neutrófilos e diminuiu o número de bactérias no peritônio e no sangue, não foi capaz de impedir a morte destes animais.

Para explicar este fato, consideramos primeiramente a meia-vida da droga, pois se sabe que esta é de 2 horas (Bowman et al, 1996). Assim, com esta meia vida de curta duração, a migração de neutrófilos estaria inibida. Passamos a avaliar o número deste tipo celular presente, na cavidade peritoneal, em períodos mais tardios. Constatamos que 12 horas após a inoculação letal o número de neutrófilos estava novamente diminuído. Além disto, o número de bactérias presentes no exsudato era maior do que o observado no grupo subletal, e a bacteremia era idêntica à observada nos animais letais não pré-tratados com aminoguanidina (Fig.7). Portanto, a não sustentação do número elevado de neutrófilos na cavidade permitiu a disseminação das bactérias. Na tentativa de mantermos o número de neutrófilos na cavidade, os animais receberam uma dose adicional de aminoguanidina 6 horas após a inoculação das bactérias. Observamos neste novo grupo experimental que, 12 horas após a inoculação letal, não havia mais redução da migração dos neutrófilos, assim como o número de bactérias no exsudato e sangue dos animais foi drasticamente menor. No que diz respeito à sobrevida, observamos diminuição da letalidade (40% de sobrevida). Assim, finalmente, demonstrou-se que

existe uma correlação entre inibição da migração de neutrófilos para o foco infeccioso mediado pelo NO e pior prognóstico da doença.

Dado importante e que está bem descrito na literatura é o papel microbicida do NO. Kaplan et al., 1996 demonstraram que a incubação de *S.aureus* com substâncias doadoras de óxido nítrico, como por exemplo, *S-nitroso-N-acethyl penicilamina* – SNAP, na ausência de neutrófilos, apresentavam viabilidade significativamente diminuída, demonstrando então a importância do óxido nítrico como agente microbicida. Ainda neste contexto, Sakiniene et al utilizaram modelo experimental de artrite e septicemia induzida por *S.aureus*, e demonstraram que a frequência, severidade da artrite, e taxas de sobrevida são piores nos animais tratados com inibidor da NOSi o LNMMA. A esta piora, no quadro da sepse, foi atribuída a pior capacidade microbicida dos macrófagos peritoneais (Sakiniene et al, 1997). Assim, baseados nos dados de literatura anteriormente citados, analisamos a hipótese de que a capacidade microbicida do animal estaria comprometida pela administração de aminoguanidina, resultando na melhora apenas parcial na sobrevida. Desta maneira, pré-tratamos o grupo de animais que receberam inóculo subletal com aminoguanidina. Observamos que o grupo que recebeu duas doses de aminoguanidina, apesar da migração de neutrófilos estar preservada, apresentava maiores quantidades de bactérias no exsudato e sangue. Conseqüentemente, a taxa de sobrevida destes animais foi 50% menor do que aqueles que receberam apenas uma dose de aminoguanidina (Fig.8), demonstrando que a aminoguanidina, quando administrada em doses maiores, compromete a capacidade microbicida dos neutrófilos.

Com o objetivo de se investigar as conseqüências do comprometimento microbicida do neutrófilo decorrentes do pré-tratamento com aminoguanidina, realizou-se análise histopatológica do pulmão dos animais pré-tratados. Observamos edema agudo de pulmão mais acentuado do que os animais que não foram pré-tratados, além do infiltrado de células polimorfonucleares (prancha I, painel C). Uma das características mais importante do *S.aureus* é a sua capacidade de liberar grande variedade de toxinas, entre elas: enterotoxinas (TSST-1 (*Toxic Shock Syndrome Toxin 1*), SEA, B, C1, C2, C3, D e E e mais recentemente duas novas enterotoxinas foram classificadas a SEG e SEI) (Mundson, 1998) e toxinas formadoras de poros (α , β , γ , δ , e leucocidina) (Sriskandan & Cohen, 1999). A importância destas toxinas pode ser exemplificada por Bhakdi et al, 1994. Estes autores demonstraram que a perfusão com fluídos que contém concentração subnanomolar de α -toxina em animais provoca edema pulmonar agudo.

Assim com a capacidade microbicida afetada através da administração de aminoguanidina, mesmo que esta previna a redução da migração de neutrófilos, não há eliminação eficiente desta bactéria, acarretando conseqüências letais aos animais. Outra particularidade desta bactéria é sua habilidade em permanecer em locais onde o hospedeiro não é capaz de combatê-lo. Foi demonstrado que *S.aureus* internalizam-se e sobrevivem em células não fagocíticas, como por exemplo células endoteliais de aorta bovina (Hamil et al, 1986) e osteoblastos (Hudson et al, 1995). Baseados nestes resultados tem sido proposto que a sobrevivência intracelular do *S.aureus* desempenha papel importante em infecções persistentes (Bayles, 1998). Assim os mecanismos de escape, característicos desta bactéria, podem ser também responsáveis pela proteção apenas parcial dos animais, quando os mesmos recebem aminoguanidina.

É conhecido que o NO desempenha papéis fisiológicos importantes, tais como: manutenção do tônus vascular periférico (Rees et al, 1998), atividade microbicida (Hampton, 1998) entre outras. Quando se utiliza droga não seletiva para a NOSi, observa-se vasoconstrição periférica e como conseqüência diminuição da perfusão tissular, disfunção dos órgãos, culminando em morte (Kubes et al. 1997). Para demonstrar que o NO envolvido em nosso modelo era proveniente da NOSi, os animais foram pré-tratados com N- ω -nitro-L-arginina (inibidor seletivo da NOS constitutiva), seguido da inoculação letal. Não observamos prevenção da redução da migração dos neutrófilos, nem mesmo melhora nas taxas de sobrevivência, sugerindo que o NO responsável por efeitos fisiológicos estava preservado com o tratamento com drogas seletivas para NOSi (fig.9).

Na peritonite induzida por SEB em camundongos, o inibidor da NOS (L-NAME) aumentou a mortalidade dos animais, sugerindo um efeito benéfico do NO liberado endogenamente, através da regulação negativa de TNF- α e IFN- γ (Florquin et al., 1994). No presente trabalho não podemos atribuir a morte dos animais após o tratamento com aminoguanidina ao aumento da produção de TNF, pois observamos níveis desta citocina em iguais magnitudes tanto nos animais que receberam inoculação letal e nos pré-tratados com aminoguanidina (Fig.3). Outra hipótese atribuída a maior taxa de mortalidade dos animais seria uma deficiência fagocítica dos neutrófilos, mas as contagens dos neutrófilos que apresentavam *S.aureus* em seu citoplasma não apresentavam diferenças entre os diferentes grupos experimentais (Tab. 3).

Assim o pré-tratamento com aminoguanidina do animal em sepse induzida por *S.aureus* apresenta um efeito benéfico, pois previne a redução da migração dos neutrófilos, melhorando seu prognóstico, mas por outro lado, a presença do NO é um componente fundamental na defesa do hospedeiro.

Para demonstrarmos a dualidade do NO no presente modelo experimental foram utilizados animais geneticamente modificados, deficientes da enzima NOSi. Observamos que os animais deficientes que receberam inóculo letal apresentaram redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Interessantemente, o número de bactérias no exsudato e sangue foi maior do que aqueles selvagens que receberam inóculo letal. A porcentagem da sobrevida dos animais deficientes que receberam inóculo letal declinou mais rapidamente do que os animais selvagens que receberam também o inóculo letal. Isto sugere grande susceptibilidade à infecção dos animais que não têm o NO como agente microbicida. Esta afirmação está correta, pois os animais deficientes que receberam inoculação subletal, quando observados 12 horas após a inoculação, apresentavam maiores quantidade de bactérias em seu exsudato do que animais selvagens. Além disto a sobrevida dos animais deficiente que receberam inóculo subletal é menor do que animais selvagens. Mais uma vez, realizamos estudo histopatológico para se avaliar os danos aos órgãos vitais, e observamos edema agudo de pulmão instalado somente 4 horas após a inoculação letal. (prancha I, painel D). Vale lembrar que o edema pulmonar nos animais selvagens que receberam inóculo letal só foi observado 12 horas após. Dados de literatura também corroboram com nossos resultados. McInnes et al., 1998, observaram que a infusão de *S.aureus* em animais deficientes para NOSi provocou aumento da incidência de artrite, aumento da magnitude de septicemia e taxas de mortalidade maiores, quando comparado com os animais selvagens. Demonstrando então que o NO é importante na defesa do organismos contra o *S. aureus*.

Diante dos resultados obtidos até aqui, estabeleceu-se então a dualidade de efeito do NO no presente modelo experimental: por um lado o NO é responsável pela redução da migração dos neutrófilos para o sítio da infecção, por outro lado sua presença é importante na defesa do organismo contra as bactérias.

Finalmente, para reforçar a hipótese de que o NO é importante na prevenção da redução da migração do neutrófilo para o foco infeccioso como demonstrado anteriormente, utilizamos a D-penicilamina (droga com afinidade pelo NO).

Observamos a prevenção da redução da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal, além de apresentarem menor quantidade de bactérias no exsudato peritoneal e no sangue (Fig.10). Confirmamos mais uma vez a importância do NO na redução da migração do neutrófilo neste modelo. Entretanto, não observamos melhora da sobrevivência dos animais pré-tratados com D-penicilamina, dados que merecem ser melhor investigados em estudos futuros.

Após estabelecermos que o NO participa da redução da migração de neutrófilos neste modelo de sepse, estudamos os mecanismos envolvidos neste fenômeno. Para tanto, utilizamos o modelo de migração *in vitro* dos neutrófilos em microcâmara. Observamos que para os agentes quimiotáticos utilizados, neutrófilos provenientes de animais que receberam inóculo letal possuíam menor capacidade de migração. Em contrapartida, os neutrófilos dos animais que receberam inóculo subletal possuíam quimiotaxia igual ou maior aos neutrófilos obtidos de animais normais (Fig.12). Além disto, os neutrófilos provenientes de animais pré-tratados com aminoguanidina têm sua capacidade quimiotática restabelecida. Estes dados demonstram que os neutrófilos apresentam menor capacidade quimiotática no modelo de sepse induzida por *S.aureus*, quando administrados com inóculo letal, e que o mediador inflamatório que desempenha papel crucial para a redução da migração é o NO.

Existem algumas hipóteses para se explicar o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na redução da migração dos neutrófilos mediada pelo NO durante a sepse. No modelo de CLP foi demonstrado que neutrófilos provenientes de animais que receberam perfurações no ceco capazes de levar a sepse letal (CLP-letal), apresentavam menor rolamento e adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular e conseqüente menor migração destas células para o foco infeccioso. Estes mesmos neutrófilos apresentavam menor expressão de CD18, enquanto que para os neutrófilos obtidos de animais pré-tratados com aminoguanidina e dos animais deficientes para a enzima NOSi não observamos redução da expressão desta molécula. Assim, no CLP a migração do neutrófilo para a cavidade peritoneal é CD18 dependente. A expressão desta molécula pode ser conseqüência do menor rolamento dos neutrófilos observados nos animais submetidos à CLP letal (Benjamim et al., dados não publicados). Desta maneira podemos sugerir que os neutrófilos dos animais que receberam inóculo letal de *S.aureus* podem apresentar alterações na expressão de CD18, reduzindo sua capacidade de quimiotaxia. Outro mecanismo pode ser proposto, pois Veldkamp et al., 2000

demonstraram que quando neutrófilos humanos eram incubados com sobrenadante de *S.aureus*, eles expressavam menor número de receptores para fMLP e C5a, como conseqüência esta célula apresentou menor capacidade quimiotáxica (*in vitro*). Por outro lado a expressão de receptores para IL-8 não foi afetada. Além disto, utilizando-se técnicas de biologia molecular que possibilitam o estudo da expressão de múltiplos genes simultaneamente (*cDNA arrays*), têm-se relatado diferenças na expressão gênica para diferentes citocinas, dependendo do estímulo utilizado. Wang et al., 2000 demonstraram que Peptidoglicano G, purificado de *S. aureus*, é mais potente em induzir a expressão de quimiocinas por monócitos humanos, do que o LPS. Isto nos sugere que o *S.aureus* pode modular a expressão gênica de algumas quimiocinas, que por sua vez terão influência na migração dos neutrófilos até o foco infeccioso. Finalmente, o estudo de mecanismos envolvidos na redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal no presente modelo de sepse será também objetivo de estudos futuros.

Após o estudo da participação do NO na redução da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos no presente modelo experimental de sepse, outra fase deste trabalho foi estabelecida: estudar a participação de células residentes como fonte de mediadores responsáveis pela inibição da migração dos neutrófilos. Com base em dados obtidos em nosso laboratório e de literatura, está bem estabelecida a participação de células residentes, como mastócitos e macrófagos, na modulação da migração leucocitária para o foco inflamatório (Souza et al., 1985). Foi observado no presente trabalho, que o aumento do número de macrófagos residentes na cavidade peritoneal, preveniu a redução da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal. Conseqüentemente houve diminuição do número de bactérias no exsudato e sangue, além de ter protegido em sua totalidade os animais que receberam inóculo letal (Fig.13). Estes resultados confirmam dados de literatura que demonstram que macrófagos são células importantes na liberação de mediadores quimiotáxicos para neutrófilos (Ferreira, 1980; Cunha et al., 1986; Ferreira, 1993). Deve-se ainda considerar o fato de que o tioglicolato elicit os macrófagos, tornando-os mais responsivos, proporcionando aos animais melhores condições de resolver a infecção no local.

Para analisarmos a participação dos mastócitos na redução da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal, diminuímos a população de mastócitos de duas maneiras diferentes: com o pré-tratamento dos animais com água destilada (Mendonça et al, 1986) (Fig.14) e com a utilização do composto 48/80 (Fig.15), droga que induz a

desgranulação destas células. Em ambos os casos o número de mastócitos residentes foi diminuído. Nos dois tratamentos foi observada a prevenção da redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais que receberam a inóculo letal, além da diminuição da quantidade de bactérias no exsudato e sangue. Quadro este acompanhado pela melhora da sobrevivência dos animais. Com o pré-tratamento com água a sobrevivência foi melhorada em 40%, e com o composto 48/80 em 100%. Mais uma vez foi possível correlacionar a presença de neutrófilos na cavidade peritoneal com a proteção do animal quanto à morte. Assim, no modelo de sepse induzida por *S.aureus*, os mastócitos são, possivelmente, uma importante fonte da liberação de mediadores inibitórios da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso.

O papel dos mastócitos na prevenção da redução da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso no presente modelo experimental não é o mesmo observado por outros autores. Malaviya et al, 1996 demonstraram que o efeito protetor dos mastócitos, se dava via a liberação de TNF, que estava associado à modulação da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal. A modulação da migração dos neutrófilos pelo TNF- α não se aplica ao presente modelo, pois quando utilizamos os animais deficientes para o receptor p55 do TNF, os neutrófilos ainda migravam para a cavidade peritoneal. Mais recentemente Ajuebour et al, 1999 demonstraram que o papel dos mastócitos residentes na migração de neutrófilos é devido à produção de quimiocinas, e que a liberação destes mediadores é dependente do tipo de estímulo migratório utilizado, no caso foram utilizados zymozan, LPS e tioglicolato. Assim as diferenças entre os modelos experimentais estão certamente influenciando no papel do mastócito sobre a migração do neutrófilos para o foco infeccioso. Desta maneira, estudos adicionais são necessários para que possamos esclarecer os mediadores liberados pelo mastócito envolvidos na redução da migração do neutrófilo para a cavidade peritoneal dos animais em sepse induzida por *S.aureus*.

6 – *Conclusões Finais*

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que na sepse induzida pelo inóculo intraperitoneal de *S.aureus*:

1. Ocorre redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos
2. A redução da migração dos neutrófilos está correlacionada no pior prognóstico da doença.
3. O TNF- α assim com o IFN- γ não participam, aparentemente, da redução da migração deste tipo celular, embora participem na atividade microbicida dos neutrófilos.
4. O NO apresenta um efeito dual: embora o óxido nítrico liberado durante a sepse esteja envolvido na redução da migração dos neutrófilos, sua presença é também importante na defesa do organismo contra o *S.aureus*
5. Os mastócitos residentes desempenham importante papel como fonte de mediadores que induzem a redução da migração dos neutrófilos para o foco infeccioso. E neste caso, a redução da migração de neutrófilos é determinante no pior prognóstico da doença.
6. Os macrófagos são células importantes para o recrutamento dos neutrófilos dos animais em sepse induzida por *S.aureus*, propiciando aos animais aumento de sobrevida.

7 – Referências Bibliográficas

Ajuebour MN, Das AM, Virág L, Flower RJ, Szabó C, Perretti M. Role for resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: Evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J. Immunology*, 1999; 162: 1685-91.

Bagby G.J., Plessala K.J., Wilson L.A, Thompson JJ, Nelson S. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor α in intravascular and peritonitis models of sepsis. *J. Infect. Dis.*; 1991; 163: 83-8.

Bannan J., Visvanathan K., Zabrieskie JB. Structure and function of streptococcal and staphylococcal superantigens in septic shock. *Infect. Dis. Clin North Am.* 1999; 13:387-96.

Bayles KW, Wesson CA, Liuo LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 1998; 66: 3336-42.

Benjamim, CF, Ferreira, SH, Cunha, FQ. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J. Infect. Dis.* 2000; 182: 214-23.

Bhakdi S, Grimminger F, Sutorp M et al., Proteinaceous bacterial toxins and pathogenesis of sepsis syndrome and septic shock: the unknown connection. *Med. Microbiol. Immunol.* 1994; 183: 119-44.

Bone R.C., Grodzin C.J., Balk R.A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997; 112: 235-43.

Bowman MA; Simell OG; Peck AG; Cornelius J; Luchetta R, Look Z; Maclaren NK, Atkinson MA. Pharmacokinetics of aminoguanidine administration and effects on the diabetes frequency in nonobese diabetic mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 2: 790-4.279

Cohen M. Changing patterns of infectious disease. *Nature*, 2000; 406: 762- 67.

Conlan, J.W. Critical Roles of Neutrophils in Host Defense against Experimental Systemic Infection of Mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 1997; 65: 630-35.

Crowley S.R. The pathogenesis of septic shock. *Heart & Lung.* 1996; 25: 124-34.

Cunha, FQ, Souza GEP and Ferreira SH. Macrophages stimulated with lipopolysaccharide release a selective neutrophil chemotactic factor: as in vivo demonstration. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1986; 19: 775-777.

Cunha F.Q., & Tamashiro W.M.S.C. Tumor necrosis factor alpha inhibit neutrophil migration *in vitro* and *in vivo*. *Med. Inflamm.* 1992; 1: 397-01.

Cunha FQ; Assreuy J; Moncada S; Liew FY. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology.* 1993b; 79: 408-11.

Cunha FQ., Assreuy J, Moss DW, Rees D, Leal LMC, Moncada S, Carrier M. et al. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxemia: role of TNF- α and IL- β . *Immunology*, 1994; 81:211-15.

Davies MG & Hagen P. Systemic inflammatory response syndrome. *Brit. J. Surg.* 1997, 84: 920-35.

De Boer ML, Kum WW, Pang LT, Chow AW. Co-production of staphylococcal enterotoxin A with toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) enhances TSST-1 mediated mortality in a D-galactosamine sensitized mouse of lethal shock. *Microb. Pathog.* 1999; 27: 61-70.

DeMeo AN and Andersen BR. Defective chemotaxis associated with serum inhibitor in cirrhotic patients. *N. Engl. J. Med.* 1972, 286: 735-40.

Dinarello PA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. 1997; 112: 321S- 29S.

Di Rosa M., Giroud J.P., Willoughby D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. *J. Pathol*. 1971; 104: 15-29.

Dong YL., Abdullah K., Yan TZ, Rutan T, Broemeling L, Robson M, Herndon DN et al. Effect of thermal injury and sepsis on neutrophil function. *J. Trauma*. 1993; 34: 417-21.

Edwards SW, Say JE, Hughes V. Gamma Interferon Enhances the Killing of *Staphylococcus aureus* by Human Neutrophils. *J. Gen. Microbiol*. 1988; 134; 37-42.

Elbin C., Prevot M.H., Bouscarat F., et al. Impaired polymorphonuclear neutrophil function in HIV-infected patients. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1995; 25 (suppl.2): 66-70..

Ellis M., Grupta S., Galant S., Hakim S, VandeVen C, Toy C, Cayro MS. Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive evaluation. *J. Infect. Dis*. 1998; 158:1268-76.

Ferreira SH. Are macrophages the body's alarm cells? *Agents and Actions*. 1980; 10: 227-30.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, & Poole S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, 1993; 110:1227-31.

Fierro I.M., Barja-Fidalgo C., Cunha F. Q. & Ferreira S.H. The involvement of nitric oxide in the anti-*candida albicans* activity of rat neutrophils. *Immunology*. 1996, 89: 295-00.

Fierro, IM, Nascimento-Da Silva V., Arruda MAB, Freitas MS, Plotkowski, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *J. Leuk. Biol*. 1999. 65:508-14.

Florquin S., Amraoui Z., Abramowicz D, Goldman M. Systemic release and protective role of IL-10 in Staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J. Immunol.*, 1994a; 153:2618-23.

Florquin S, Amraoui Z., Dubois C, Decuyper J, Goldman M. the protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J. Exp. Med.* 1994b; 180:1153-58.

Franchini KG; Torsini AS; Soares HA; Saad MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinas induced by pressure overload in rat heart. *Circ. Res.* 2000; 87: 558-565.

Friedman, G; Silva E, Vicent J-L. Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit. Care Med.* 1998; 26:2078-2086.

Furfine E.S., Harmon M.F., Paith J.R. et al. Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-NG-Nitroarginina. *Biochemistry.* 1993; 32: 8512-17.

Fukatsu K., Saito H., Fukushima R.; Inoue T.; Lin MT., Inaba T; Muto T. Detrimental effects of a nitric oxide synthase inhibitor (N-omega-nitro-L-arginine-methyl-ester) in a murine sepsis model. *Arch. Surg.* 1995; 130: 410-14.

Griffiths, MJD; Messent, M, Macallister RJ. Et al. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 110, 963-968.

Hack CE, Hart M, van Schijndel RJMS; Eerenberg AJM; Nuijens JH; Thijs LG; Aarden LA. Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect. Immun.* 1992; 60: 2835-42.

Hamill RJ, Vann JM & Proctor RA. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect. Immun.* 54: 833-836, 1986.

Hampton M.B., Kettle A J., and Winterbourn C.C. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998; 92(9): 3007-3017.

Hechtman DH; Cybulsky MI; Fuchs HJ; Baker JB; Gimbrone MA. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J. Immunol*. 1991; 147: 883-92.

Heumann D; Barras C; Severin A; Glauser MP; Tomasz A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect. Immun*. 1994; 62: 2715-21.

Hickey MJ; Sharkey K.A; Sihota EG; Reinhart PH; Macmicking JD; Nathan C. and Kubes P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *The FASEB J*. 1997; 11:955-64.

Hinshaw LB; Emerson T.E Jr., Taylor FBJr.; Chang AC; Duerr M; Peer JT; Flournoy PT et al. Lethal staphylococcus aureus-induced shock in primates: prevention of death with anti-TNF antibody. *J. Trauma*. 1992; 33: 568-73.

Hong Xu, Gonzalo JA; Pierre Y St; Willians IR; Kupper TS; Cotran RS; Springer TA; et al. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1 – deficient mice. *J. Exp. Med*. 1994; 180:95-109.

Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC, Willians AS et al. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb. Pathol*. 1995; 19: 409-419.

Inoue RY; Gontijo JAR and Franchini KG. Hemodilution mediates hemodynamic changes during acute expansion in unanesthetized rats. *Am. J. Reg. Inter. Comp. Physiol*. 2000. 279: R2243-R2251.

Joyce DA., Forrest MJ., Brooks PM. D-penicillamine metabolism in an *in-vivo* model of inflamed synovium. *Agents and Action*. 1988; 24: 336-43.

Kaplan SS, Lancaster JR, Brasford RE; Simmons RL. Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infec. Immun.* 1996; 64: 69-76.

Kengatharan KM; De Kimpe SJ; Thiemermann C. Role of nitric oxide in the circulatory failure and organ injury in a rodent model of Gram-positive bacteria. *Brit. J. Pharmacol.* 1996; 119: 1411-21.

Knowles R.G. & Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 1994; 298: 249-258.

Krakauer T. Interleukin-8 production by human monocytic cells in response to staphylococcal exotoxins is direct and independent of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J. Infect. Dis.* 1998; 178: 573-77.

Kubes P., Suzuki M; Granger D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 4651-55.

Kubes P, Sihota E., & Hickey MJ. Endogenous but not exogenous nitric oxide decreases TNF- α -induced leukocyte rolling. *A. J. Physiol.* 1997; 273: G628-G635.

Ley P; Baker JB; Cybulsky MI; Gimbrone MA; Luscinskas FW. Intravenous interleukin-8 inhibits granulocyte emigration from rabbit mesenteric venular without altering L-selectin expression or leukocyte rolling. *J. Immunol.* 1993; 151: 6347-57.

Li P., Allen, H., Banerjee S., et al. Mice deficient in IL-2 beta-converting enzyme are deficient in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell.* 1995, 80:401-411.

Lowell C.A & Berton G. Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Immunology.* 1998; 95: 7580-84.

Lynn WA & Cohen J. Adjunctive therapy for septic shock: a review of experimental approaches. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 20: 143-58.

Malaviya R., Iketa T; Abraham SN. Modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature.* 1996; 381: 77-79.

Malawista ES; Montgomery RR; Van Blaricom G. Evidence for Nitrogen Intermediates in Killing of Staphylococci by human Cytoplasts. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 631-36.

Mazolewski P.J., Barber A, Williams S; Simoni J; Davis S; Shires GT. Attenuating tumor necrosis factor alpha does not ameliorate other cytokine and peroxidase products during sepsis. *Am. J. Sug.*, 1999; 178:556-59.

McInnes IB, Leung B, Wei XQ; Gemmell CC; Liew FY. Septic arthritis following *Staphylococcus aureus* infection in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 1998; 160: 308-15.

Mendonça VO; Vugman I; Jamur MC. Maturation of adult rat peritoneal and mesenteric mast cells. A morphological and histofluorescence study. *Cell Tissue Res.*1986; 243:635-39.

Miethke T; Duschek K; Wahl C; Heeg K; Wagner H. Pathogenesis of the toxic shock syndrome: T cell mediated lethal shock caused by the superantigen TSST-1. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 1494-500.

Miethke T., Wahl C, Heeg K.; Echtenacher B; Krammer PH; Wagner PH. T-cell mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor . *J. Exp. Med.* 1992; 175: 91-98.

Mollinedo F; Borregaard N; Boxer LA. Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunol. Today.* 1999; 20: 535-37.

Quezado ZMN; Banks SM; Natanson CQ. New strategies for combatting sepsis: the magic bullets missed the mark... but the search continues. *Tibtech*. 1995 13: 56-63.

Rainard P; Riollet C; Poutrel B; Paape MJ. Phagocytosis and Killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor-alpha and des-arginine derivative of C5a. *Am. J. Vet. Res.* 2000; 61: 951-59.

Rees DD; Monkhouse JE; Cambridge D; Moncada S. Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in conscious mouse. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 124:540-46.

Rocha N.P. & Ferreira S.H. Restoration by levamisole of endotoxin-inhibited neutrophil migration, oedema and increased permeability induced by carrageenin. *Eur. J. Pharmacol.* 1986; 122: 87-92.

Sands KE, Bates DW, Lancken PN; Graman PS; Hibberd PL; Kahn KL; et al. Epidemiology of Sepsis Syndrome in 8 Academic Medical Centers. *JAMA*. 1997; 278: 234-40.

Sakinienė E., Bremell T & Tarkowisk A. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) aggravates *Staphylococcus aureus* septicaemia and septic arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 110: 370-77

Schleifenbaum B., Fehr J., Odermat and Sperb R. Inhibition of leukocyte emigration induced during the systemic inflammatory reaction *in vivo* is not due to IL-8. *J. Immunol.* 1997; 161: 3631-38.

Scott M.G; Gold M.R; Hancock REW. Interaction of cationic peptides with lipoteichoic acid and Gram-positive bacteria. *Infect. Immun.* 1999; 67: 6445-53.

Silva J.S., Vespa G.N.R., Cardoso M.A.G. ET et al. Tumour necrosis factor alpha mediates resistance to *trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide

production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.* 1995; 63: 4862-67.

Smith MJH; Ford-Hutchinson AW; Walker JR. Anti-inflammatory activity of bacterial endotoxin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1977; 29:702-07.

Soederquist B; Sundqvist KG; Vikerfors T. Adhesion molecules (E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in sera from patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia with or without endocarditis. *Clin. & Exp. Immunol.* 1999; 118:408-11.

Souza G.E.P., Cunha F.Q and Ferreira S.H. Resident macrophages control initial neutrophil migration in the acute inflammatory response. *Inflammatory mediators.* 1985; 149-55. Edited by G.A. Higgs and T.J. Williams

Souza G.E.P., Cunha F.Q., Mello C.R. and Ferreira S.H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. *Agents Actions.* 1988; 24:377-80.

Spika JS; Peterson PK; Wilkinson BJ; Hammerchimidt DE; Verbrught HA; Verhoef J; Quie. Role of peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* in leukopenia, and thrombocytopenia, and complement activation associated with bacteremia. *J. Infect. Dis.* 1982; 146: 227-34.

Springer T.A Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994; 77: 301-14.

Striskandan, S & Cohen J. Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from-negative sepsis. *Infect. Dis. North Am.* 1999; 13: 397-412.

Standiford TJ; Arenberg TA; Danforth JM; Kunkel SL; VanOtteren GM; Strieter RM. Lipoteichoic acid induces secretion of IL-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Infect. Immun.* 1994; 62: 119-25.

Steeber DA; Tang MLK; Green EN; Zhang XQ; Sloane JE; Tedder TF. Leukocyte entry of inflammation requires overlappig interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J. Immunol.* 1999; 163: 2176-86.

Stewart TE.& Zhang H. Nitric Oxide in sepsis. *Respir. Care*, 1999; 44: 308-13.

Tarkowski A. Preventing staphylococcal disease by disarming the immune response to infection. *Arch. Immun. Ther. Exp.* 2000; 48: 21-26.

Takala A, Jousela I., Jansson S.E; Olkolla KT; Takunen O; Orpana A; Karonen SL; Repo H. Markers of systemic inflammation predicting organ failure in community-acquired septic shock. *Clin. Sci. (Colch)*. 1999, 97: 529-38.

Takakuwa T, Endo S., Shirakura Y; Yokoyama M; Tamatani M; Tohyama M; Aozasa K; Inada K. Interleukin-10 gene transfer improves the survival rate of mice inoculated with *Escherichia coli*. *Crit. Care Med.* 2000; 28: 2685-9.

Tavares-Murta B.M., Cunha F.Q., and Ferreira S.H. The intravenous administration of tumor necrosis factor, interleukin-8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. *Brit. J. Pharmacol.* 1998; 124: 1369-74.

Territo M.C. & Golde D.W. Granulocyte function in experimental human endotoxemia. *Blood.* 1976; 47: 539-44.

Tracey K.J; Beutler B; Lowry SF; Merryweather J; Wolpe S; Milsark IW; Hariri RJ; Farrey III TJ; et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachecin. *Science.* 1986; 234: 470-4.

Tracey K.J., Fong Y; Hesse DG; Manogue KR; Lee AT; Kuo GC; Lowry SF; Ceramy A. Anti-cachectin/ TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during bacteraemia. *Nature.* 1987; 330(6149): 662-4.

Tracey W.R., Nakane M., Kuk J., et al. The nitric oxide synthase inhibitor, L-NG-monomethylarginine, reduces carrageen-induced pleurisy in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 273: 1295-99.

Vann der Poll T; Malefyt RW; Coyle SM; Lowry SF. Antiinflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia: sequential measurements of plasma soluble Interleukin(IL)-1 receptor type II, IL-10, and IL-13. *J. Exp. Med.* 1997; 175: 118-22.

Van Dijk, W.C., Verbrugh H.A., Van der Tol M.E. et al. Interaction of fagocytic and bacterial cells in patients with bacteraemia caused by Gram-negative rods. *J. Infect. Dis.*, 1980; 141: 441-48.

Vann JM & Proctor RA. Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time- and dose-dependent damage to endothelial cell monolayers. *Infect. Immun.* 1987; 55: 2155-63.

Veldkamp KE; Heezius HCJM; Verhoef J; van Strijp JAG; van Kessel KPM. Modulation of neutrophils chemokine receptors by *Staphylococcus aureus* supernate. *Infect. Immun.* 2000; 68: 5908-13.

Verdrengh M. & Tarkowski A. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 1997; 65: 2517-21.

Waage A, Brandtzaeg P., Halstensen A, Kierkulf P; Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin-6, interleukin-1, and fatal outcome. *J. Exp. Med.* 1989; 169: 333-38.

Wagner JG & Roth RA. Neutrophil migration during endotoxemia. *J. Leuc. Biol.* 1999; 66: 10-24.

Wang ZM; Liu C; Dziarski R. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 20260-67.

Ware LB, and Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N.E.J.M.* 2000; 4: 1334-49.

Wei X., Charles I.G., Smith A; Ure J; Feng GJ; Huang FP; Xu D; et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 1995; 375: 408-11.

Wolkow P P. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm. Res.* 1998; 47: 152-66.

Zhao YE. & Tarkowski A. Impact of Interferon- γ Receptor Deficiency on Experimental *Staphylococcus aureus* Septicemia and Arthritis. *J. Immunol.* 1995; 155: 5736-42.

Zhao YE; Nilsson I.M.; Tarkowski A. The role of interferon-gamma in experimental *Staphylococcus aureus* septicaemia versus arthritis. *Immunology.* 1998; 93: 80-5.

Summary

Septic shock is one of the leading causes of mortality among severely ill patients in intensive care units all over the world, with mortality rates ranging from 35% to 45% of patients. Today the incidence of Gram-positive bacteria is similar to that of Gram-negative bacteria in terms of the pathogenesis of sepsis (Sriskandan & Cohen, 1999), thus pointing out the importance of better understanding the mechanisms involved in Gram-positive septicemia.

The objective of the present study were: a – to establish a *Staphylococcus aureus* model of Gram-positive sepsis in mice; b – to define the failure of neutrophil migration towards the infectious focus in the present model; c – to analyze the role of TNF- α , IFN- γ and NO in the failure of neutrophil migration; d - to define the role of the other resident cells in the process, such as resident macrophages and mast cells.

We first observed that a sublethal (SL-group) challenge with *Staphylococcus aureus* (0.5×10^9 UFC/cavity) caused a neutrophil migration of 9×10^6 cells per abdominal cavity. The mice did not present bacteremia. On the other hand, lethal challenge (L-group) (16×10^9 UFC/cavity) caused severely bacteremia and death within 24 h with failure of neutrophil migration to the focus (4×10^6 cells/cavity). Twelve hours after the lethal challenge, histopathological analysis of multiple organ failure revealed diffuse lung edema and an intense PMN infiltrate in both organs. The failure of neutrophil migration was not due to neutropenia or hemodynamic alterations, since the leukogram of the L-group showed neutrophilia 4 hours before bacterial inoculation and arterial blood pressure monitoring did not show a significant difference compared to the SL-group.

The same pattern of response to lethal bacterial inoculation was observed in knockout mice lacking p55R for deficient TNF-alpha or IFN-gamma production, thus suggesting an irrelevant role of both TNF-alpha and IFN-gamma in the failure of neutrophil migration to the abdominal cavity. On the other hand, SL-deficient mice presented a decreasing survival rate and an increased bacterial number in peritoneal fluid, suggesting the importance of both cytokines in bactericidal activity.

The failure of neutrophil migration was prevented in aminoguanidine- or D-penicillamine-pre-treated animals. This was accompanied by a decrease in bacterial number in the peritoneal fluids and in bacteremia. On the other hand, aminoguanidine did not prevent animal death. The addition of a lower aminoguanidine dose (5 mg/kg) 6 hours after lethal inoculation was able to induce a decrease in bacterial number in the peritoneal fluid and in bacteremia. This result indicates the relevant role of NO in the failure of neutrophil migration.

To investigate the role of NO in bactericidal activity against *S. aureus*, we administered two doses of aminoguanidine to the SL-group, which caused increased bacterial numbers in peritoneal fluid and bacteremia, accompanied by a decrease in survival rate. In addition, NOSi-deficient animals inoculated with SL also presented an increase in bacterial number in peritoneal fluid and a decrease in survival rate. Taken together, the present results lead us to speculate that the low survival rate was a consequence of an impairment of the bactericidal activity of neutrophils due to the lack of NO.

In vitro neutrophil migration experiments using a microchamber demonstrated that neutrophil from mice challenged with the lethal bacterial dose presented an impaired migration compared to cells from sublethally inoculated animals. Moreover, the results for control animals (no bacterial challenge) were similar results to those for the SL-group. Similarly to the *in vivo* data, aminoguanidine-pre-treated animals recovered their migration chemotactic activity.

The increase in resident peritoneal macrophages and the decrease in mast cells prevented neutrophil migration failure, decreased bacterial number in peritoneal fluid and bacteremia and prevented death in 100% of animals. These results demonstrate the importance of mast cells as sources of mediator(s) involved in the failure of neutrophil migration, and that macrophages are important for protecting the animals against infection.

In conclusion, it was demonstrated that NO plays an important role in the failure of neutrophil migration to the infectious focus and is important in the killing of *S. aureus* in the present experimental model of sepsis.