



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

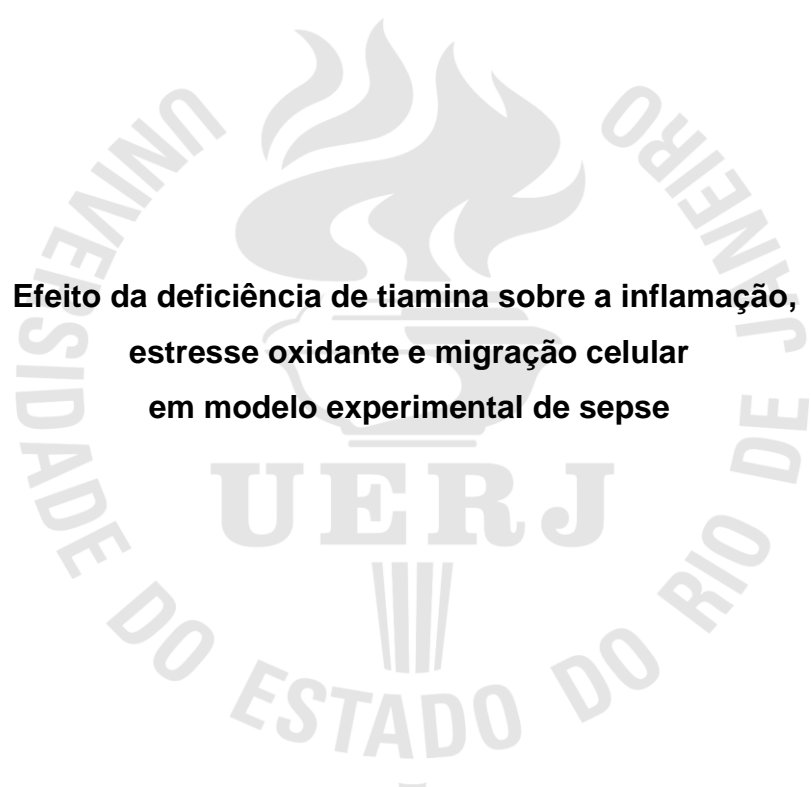
José Antenor Araújo de Andrade

**Efeito da deficiência de tiamina sobre a inflamação,
estresse oxidante e migração celular
em modelo experimental de sepse**

Rio de Janeiro

2012

José Antenor Araújo de Andrade



**Efeito da deficiência de tiamina sobre a inflamação,
estresse oxidante e migração celular
em modelo experimental de sepse**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio da Cunha

Coorientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Torres Bozza

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A553 Andrade, José Antenor Araújo de.
Efeito da deficiência de tiamina sobre a inflamação, estresse oxidante e migração celular em modelo experimental de sepse / José Antenor Araújo de Andrade. – 2012.
66 f.

Orientador: Sérgio da Cunha
Coorientadora: Patrícia Torres Bozza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Tiamina – Teses. 2. Sepse – Teses. 3. Estresse oxidativo. 4. Inflamação – Teses. I. Cunha, Sérgio da. II. Bozza, Patrícia Torres. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.39

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

José Antenor Araújo de Andrade

**Efeito da deficiência de tiamina sobre a inflamação,
estresse oxidante e migração celular
em modelo experimental de sepse**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 31 de outubro de 2012.

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Patrícia Torres Bozza
Fundação Oswaldo Cruz

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sérgio da Cunha (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. André Miguel Japiassú
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À Barbara, meu amor, esposa e companheira, por todas as vezes que estive ausente e ainda assim sempre me apoiando. À Maria Júlia e José Vicente, meus filhos muito amados, com os quais aprendo diariamente durante minha função de ensinar. Aos meus pais, Ana Maria (*in memoriam*) e Benedito, pelo amor e orientação para a vida; e à minha irmã Adriana, minha amiga.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, coordenador do programa de Pós-graduação em Biologia Humana Experimental – BHEX / UERJ, por ter acreditado neste ‘estranho no ninho’ e apoiado esse estudo, mesmo diante de um contexto de dificuldades que quase o inviabilizaram, o meu sincero muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Sérgio da Cunha (orientador), professor da Faculdade de Ciências Médicas, FCM-UERJ e chefe do Centro de Terapia Intensiva do Hospital Universitário Pedro Ernesto, HUPE-UERJ, um orientador assíduo em bancada e presente na solução dos eventuais problemas. Uma figura tão serena quanto atuante, com quem eu aprendo como profissional e como pessoa. Conseguimos!

A Prof.^a Dra. Patrícia Torres Bozza (co-orientadora), pesquisadora titular do Laboratório de Imunofarmacologia IOC – FIOCRUZ, por ter aberto as portas de seu departamento ao nosso trabalho, contribuindo decisivamente para a conclusão deste estudo, no que esperamos tenha sido o marco inicial para uma cooperação acadêmica fértil entre o programa de pós-graduação em Biologia Humana Experimental – BHEX com seu laboratório na FIOCRUZ.

Aos professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – IBRAG – UERJ: Prof.^a Dra. Márcia Cristina Paes, Prof.^a Dra. Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos e Prof. Dr. Frederico Freire Bastos pelas imprescindíveis contribuições na compreensão da bioquímica, um terreno felizmente cada vez menos inóspito para mim.

A Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho, professora do Departamento de Bioquímica – UERJ e a Michele Gonçalves, bioterista, pela constante assistência no trabalho com os animais no biotério do Departamento de Bioquímica – UERJ.

Ao Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto, professor e pesquisador do Laboratório de Bioquímica Toxicológica do Departamento de Bioquímica – UERJ por um envolvimento sem par com esse estudo e por um entusiasmo muitas vezes maior do que o meu próprio. Sempre disposto a discutir alguma nova nuance da tiamina que tenha lhe passado pela cabeça e sempre com um sorriso acolhedor e um firme aperto de mão, próprio das pessoas de bem. Acredite professor, o senhor além de ciência, também ensina valores!

No dia-a-dia da bancada, contei com a contribuição intelectual e treinamento em várias técnicas tanto na FIOCRUZ (Prof.^a Dra. Rachel Novaes Gomes, doutorandos Raphael Molinaro Coelho, Mariana Gisely Amarante Teixeira da Cunha, de aluno de iniciação científica Silvio Caetano Alves Junior e bioterista Nelson Rêgo) quanto no Departamento de Bioquímica – UERJ (Prof.^a Dra. Natália Pereira de Almeida Nogueira, doutorandos Carlucio Rocha dos Santos. Eduardo dos Santos Silva, Santiago Alonso Tobar Leitão e alunas de iniciação científica Francis Monique de Souza Saraiva, Jéssica Ísis Oliveira de Paula).

A contribuição das equipes técnicas dos laboratórios do Departamento de Bioquímica – UERJ foram de grande valor, executadas por Lin Machado de Lima, Paulo Roberto Marques, Roosevelt de Aguiar Dias, Carlos Roberto Machado Gayer MSc, que sempre me fizeram sentir em casa com sua amizade.

Um abraço carinhoso a Sra. Lucy Martins, auxiliar de serviços gerais do Departamento de Bioquímica – UERJ, sempre simpática e com uma palavra de incentivo.

Agradeço ainda a Sra. Ângela Velho, chefe da Biblioteca Biomédica A – UERJ, por sua atenção e auxílio na formatação dessa dissertação.

RESUMO

ANDRADE, José Antenor Araújo de. *Efeito da deficiência de tiamina sobre a inflamação, estresse oxidante e migração celular em modelo experimental de sepse*. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A sepse é uma condição de elevada letalidade muito frequente em pacientes graves e pode estar associada à deficiência de vitamina B1 ou tiamina. Sendo a tiamina fundamental para produção de energia, restauração do poder redutor e síntese de ribose e desoxirribose celulares, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da deficiência de tiamina sobre a resposta inflamatória, através da medida de interleucinas, o estresse oxidante, pela determinação do 4-hidróxi 2-nonenal (4-HNE) um produto de peroxidação de lipídeos de membrana e a migração celular em modelo experimental de sepse. Em um primeiro experimento foi determinada a concentração de pirofosfato de tiamina (PPT) no sangue de camundongos c57bl6 alimentados com ração completa e com ração deficiente em tiamina, para determinação do tempo necessário para a indução de deficiência dessa vitamina. Em um segundo experimento foi utilizada a ligadura e perfuração cecal (CLP) como modelo de sepse em quatro grupos: SHAM ração completa, SHAM ração deficiente em tiamina, CLP ração completa, CLP ração deficiente em tiamina. As concentrações de PPT no sangue foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência. As dosagens séricas e no líquido peritoneal de TNF- α , IL-1 β , IL-6, KC e MCP-1/CCL2 foram realizadas por ELISA. O nível de 4-hidroxi,2-nonenal (4-HNE) no fígado foi avaliado por Western Blot. Contagem de leucócitos no sangue e no líquido peritoneal foi feita por microscopia óptica. Foi avaliada a concentração de bactérias no líquido peritoneal. Nos animais alimentados com ração completa a concentração média de PPT foi $303 \pm 42,6$ nM, e a deficiência de tiamina foi induzida após 10 dias de ingestão da ração pobre em tiamina, quando observou-se concentração de $12,5 \pm 2,4$ nM. No lavado peritoneal dos animais submetidos à CLP e privados de tiamina observou-se nível significativamente maior de TNF- α e MCP-1. A IL-1 β foi menor no sangue do mesmo grupo. A expressão de 4-HNE foi maior nos grupos privados de tiamina. Quanto à celularidade sanguínea, observou-se apenas maior contagem de mononucleares no grupo submetido à CLP e privado de tiamina. No líquido peritoneal, a contagem de leucócitos totais, mononucleares e monócitos foi mais elevada nos grupos CLP, mas sem relação com o tipo de dieta. No entanto, no líquido peritoneal o grupo CLP deficiente em tiamina revelou população bacteriana significativamente menor que o grupo alimentado com ração completa e os grupos sham. Concluiu-se que a deficiência de tiamina associou-se com aumento da morte bacteriana na cavidade peritoneal, aumento do estresse oxidante, e mudanças na resposta inflamatória.

Palavras-chave: Tiamina. Sepse. Estresse oxidante. Inflamação. Modelo de sepse.

ABSTRACT

Sepsis is a prevalent condition in critically ill patients and may be associated with thiamine deficiency (TD). Since thiamine is important for energy production, redox power recovering and ribosis and desoxyribosis synthesis, the aim of this study was to evaluate TD effect in inflammation, oxidative stress and cell recruitment in a sepsis model. Thiamine pyrophosphate (TPP) normal concentration was determined in blood of c57bl6 mice fed with AIN93G chow and also in animals fed with similar AIN93G chow without thiamine in order to determine the time required to produce TD. Another experiment was carried out with cecal ligation and puncture (CLP) as the sepsis model with four groups: SHAM with AIN93G complete chow, SHAM with TD chow, CLP with AIN93G complete chow and CLP with TD chow. TPP blood concentrations were determined by HPLC/Fluorescence. Blood and peritoneal liquid TNF- α , IL-1, IL-6, KC and MCP-1/CCL2 determinations were performed by ELISA. The expression of 4-HNE was performed by Western Blot. Blood and peritoneal liquid leukocytes counting were performed by optical microscopy. Peritoneal liquid bacterial concentration was determined. Blood TPP mean concentration in AIN93G complete chow was 287.9 ± 27.8 nM and TD occurred in 10 days in TD chow group and blood concentration in this group was 12.5 ± 2.4 nM. Peritoneal liquid TNF- α and MCP-1 concentrations were significantly greater in CLP with TD chow group than the other groups. Blood IL1- β was lower in the same group. Liver 4-HNE expression was highest in TD groups. Blood mononuclear number was greater in CLP TD chow group the others. Peritoneal liquid leukocytes, mononuclears and neutrophils numbers were detected in greater number in the same group. However, peritoneal liquid bacterial concentration was significantly lower in the same group. In conclusion TD was associated with greater bacterial killing in peritoneal liquid, greater oxidative stress and change in inflammatory response.

Keywords: Thiamine. Sepsis. Oxidative stress. Inflammation. Sepsis model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Relação entre infecção, sepse e SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica), em relação a alguns agentes causais.....	18
Figura 2 –	Fórmula estrutural da tiamina e do pirofosfato de tiamina.....	21
Figura 3 –	Localização das enzimas dependentes de tiamina na via glicolítica, na via das pentoses fosfato e no ciclo de Krebs.....	22
Figura 4 –	Sumário da resposta imunológica inata e adaptativa.....	25
Figura 5 –	Desenho do Experimento 1 para a determinação do número de dias necessários para instalação de deficiência de tiamina nessa espécie, com a ração pobre em tiamina usada nesse estudo.....	33
Figura 6 –	Desenho do experimento 2 onde o modelo de sepse é CLP (ligadura e perfuração de ceco).....	34
Figura 7 –	Etapas do procedimento CLP.....	36
Figura 8 –	Evolução do consumo médio de ração (AIN93G completa e ração deficiente de tiamina), do 10 ^o , 15 ^o , 20 ^o e 25 ^o dias do primeiro experimento.....	42
Figura 9 –	Evolução da massa corporal dos camundongos alimentados com ração AIN93G completa e ração deficiente em tiamina, respectivamente, entre o início do experimento e 25 ^o dia.....	43
Figura 10 –	Média das concentrações de PPT obtidas (com respectivos intervalos de confiança, IC 95%) para os grupos: (1) controle (#, diferente dos demais), (2) grupo com 10 dias de privação e (3) grupo com 15 dias de privação.....	44
Figura 11 –	Média das concentrações de PPT encontradas no segundo experimento, para os grupos: (1) sham AIN93G; (2) CLP AIN93G; (3) sham com ração deficiente em tiamina e (4) CLP com ração deficiente em tiamina. Grupos 3 e 4 diferentes dos grupos 1 e 2.....	45
Figura 12 –	Detalhes de bandas obtidas por western blot de fígado de camundongos c57bl6, para os grupos estudados (poços numerados de 1 a 10). Acima: exemplo de gel e abaixo: membrana correspondente corada com Ponceau S como controle de carregamento. PM: padrão molecular de massa no 1 ^o poço.....	46

Figura 13 –	Densitometria ótica de bandas para os grupos estudados, com diferença entre os grupos com ração deficiente em tiamina (com expressão mais elevada de 4-HNE em fígado) e os demais.....	47
Figura 14 –	Níveis de detecção de TNF- α em sangue e lavado peritoneal com a diferença (#) entre os grupos CLP ração completa e CLP ração deficiente em tiamina.....	48
Figura 15 –	Níveis de detecção de IL-1 β em sangue e lavado peritoneal com a diferença entre o grupo CLP ração deficiente em tiamina e os demais grupos(#), e entre o grupo CLP ração completa e os demais grupos(*).....	49
Figura 16 –	Níveis de IL-6 no sangue e no lavado peritoneal com a diferença entre o grupo CLP ração deficiente em tiamina e os demais grupos(#), e entre o grupo CLP ração completa e os demais grupos(*).....	49
Figura 17 –	Níveis de detecção de MCP-1 em sangue com a diferença entre o grupo CLP ração deficiente em tiamina e os demais grupos(#)..	50
Figura 18 –	Níveis de detecção de KC em sangue com a diferença entre o grupo CLP ração deficiente em tiamina e os demais grupos (#), e entre o grupo CLP ração completa e os demais grupos (*).....	51
Figura 19 –	Contagem no sangue periférico de glóbulos brancos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) para os grupos: SHAM ração completa, SHAM ração deficiente de tiamina, CLP ração completa e CLP ração deficiente de tiamina. * p < 0,05.....	52
Figura 20 –	Contagem no lavado peritoneal de glóbulos brancos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C). As diferenças assinaladas (*) referem-se à comparação entre CLP ração completa e SHAM ração completa, e CLP ração deficiente e SHAM ração deficiente.....	52
Figura 21 –	Recuperação bacteriana no lavado peritoneal, onde (*) representa existência de diferença significativa entre os grupos....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE –	4-hidroxi,2-nonenal
ACCP –	American College of Chest Physicians
acetil-CoA –	acetil coenzima A
AIN93G –	tipo padronizado de ração para animais de experimentação, do American Institute of Nutrition
APC –	antigen-presenting cell
c57bl6 –	linhagem de camundongo
CAT –	catalase
EO –	estresse oxidante
ERO –	espécies reativas de oxigênio
GPx –	glutathione peroxidase
GSH –	glutathione reduzida
GSSG –	glutathione oxidada
HPLC –	high performance liquid chromatography
IL –	interleucina
IL-1 β –	interleucina 1 beta
INF- γ -	interferon gama
iNOS -	óxido nítrico sintase indutível
KC -	keratinocyte-derived chemokine (equivalente murino da IL-8)
MCP-1/CCL2 –	proteína quimiotática de monocitos
NADPH -	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosforada reduzida
NK –	célula natural killer
NO –	óxido nítrico
PaCO ₂ -	pressão parcial arterial de gás carbônico

PAMP -	pathogen-associated molecular patterns
RCF -	relative centrifugal force
SCCM -	Society of Critical Care Medicine
SIRS -	systemic inflammatory response síndrome
SNC -	sistema nervoso central
SOD -	superóxido dismutase
TCA -	ácido tricloroacético
PPT -	pirofosfato de tiamina
α -KGDH -	alfa-cetogluturato desidrogenase
λ EM -	comprimento de onda de emissão
λ EX -	comprimento de onda de excitação

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1	Sepse: definição e relevância.....	17
1.2	Tiamina.....	20
1.3	Modelos experimentais de sepse.....	22
1.4	Marcadores de resposta inflamatória.....	23
1.5	Estresse oxidante.....	25
1.6	Relação entre tiamina, resposta inflamatória e estresse oxidante..	27
2	OBJETIVO.....	30
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	Manuseio dos animais de experimentação.....	31
3.2	Manejo dietético preliminar dos animais no primeiro experimento	31
3.3	Determinação do tempo necessário para a indução de deficiência de tiamina.....	32
3.4	Procedimento de sepse experimental (CLP).....	33
3.5	Anestesia e procedimentos cirúrgicos.....	34
3.5.1	<u>Procedimento de CLP.....</u>	34
3.5.2	<u>Eutanásia e recolhimento de sangue e fígado.....</u>	35
3.6	Determinação de PPT em HPLC por fluorimetria.....	36
3.7	Detecção de 4-HNE por western blot.....	38
3.8	Dosagem de citocinas e quimiocinas.....	39
3.9	Contagem de leucócitos em sangue periférico.....	39
3.10	Contagem de leucócitos em lavado peritoneal.....	40
3.11	Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em lavado peritoneal.....	40
3.12	Análise estatística.....	40
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Evolução do consumo de ração e massa corporal dos animais.....	42

4.2	Determinação do tempo necessário para a indução de deficiência de tiamina.....	43
4.3	Níveis de tiamina no segundo experimento.....	44
4.4	Detecção de 4-HNE por western blot.....	45
4.5	Dosagem de interleucinas em sangue e lavado peritoneal.....	47
4.5.1	<u>TNF-α</u>	47
4.5.2	<u>IL-1β</u>	48
4.5.3	<u>IL-6</u>	48
4.5.4	<u>MCP-1</u>	50
4.5.5	<u>KC</u>	50
4.6	Contagem celular no sangue e lavado peritoneal.....	51
4.7	Recuperação bacteriana no lavado peritoneal.....	53
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	ANEXO – Termo de consentimento da Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais.....	66

INTRODUÇÃO

A infecção faz parte da vida desde os primórdios. Pode ser encarada como uma interação mal sucedida entre um hospedeiro agredido e um agente que o exaure. Apesar de crescente conhecimento sobre o tema, ainda observamos grande letalidade associada à formas graves de infecção.

A resposta do hospedeiro frente à injúria, originalmente com objetivo de remoção do agente lesivo e tentativa de reparo, se mal modulada pode ser tão ou mais danosa que a simples presença do agente. A intensidade da resposta orgânica e sua repercussão determinam critérios clínicos cunhados para a identificação da dita síndrome da resposta inflamatória sistêmica (1), que associada à infecção compõe o quadro de sepse (2,3).

Estudos epidemiológicos no mundo (4,5,6) e no Brasil (7,8) apontam para uma mesma direção a respeito da sepse: uma condição prevalente, de elevada mortalidade, associada com a emergência de germes multirresistentes (9,10) e de elevado custo social e financeiro (11). No mundo, bem como no Brasil a padronização e real execução de medidas de enfrentamento da sepse baseadas em evidências são uma importante linha de ação (12).

Do ponto de vista da repercussão clínica, se sabe que a deficiência de nutrientes, quer por ingesta insuficiente ou perda determina pior prognóstico em várias doenças. Em relação à tiamina, uma vitamina hidrossolúvel e sua deficiência está relacionada a alterações neurológicas e cardíacas (13). O pirofosfato de tiamina (forma biologicamente ativa dessa vitamina) é um importante cofator enzimático mitocondrial (14) com papel fundamental no equilíbrio energético. No paciente grave e no ambiente de terapia intensiva vários são os fatores que contribuem para um estado nutricional deficiente em tiamina, principalmente: nutrição inadequada, reposição insuficiente, utilização de diuréticos, uso de medidas substitutivas renais como a hemodiálise o que ajuda a explicar os dados de literatura que mostram a frequência da deficiência de tiamina (15). A deficiência de tiamina além de alterações cardíacas do tipo insuficiência cardíaca (beri-beri) e neurológicas (encefalopatia de Wernicke) (13) está associada à alteração neurológica funcional, associada a doenças degenerativas cerebrais como as doenças de Parkinson e Alzheimer (16,17,18).

Chegamos então ao cenário de interesse desse trabalho: diante de infecção a resposta da inflamação pode determinar desequilíbrio entre mecanismos originalmente de defesa e reparo, principalmente se levarmos em conta as mudanças no cenário como hospitalização, procedimentos mais invasivos, antibióticos, desatenção aos cuidados de higiene e prevenção de infecção e mudanças nos personagens: indivíduos mais idosos, distúrbios nutricionais mais frequentes ou provocados por condutas nutricionais equivocadas, maior prevalência de doenças crônico-degenerativas, variadas formas de imunossupressão, emergência de patógenos mais potentes tendo como grave consequência a sepse (2,3,6,15).

O estudo de certas facetas da sepse, por conta de limitações éticas, nas fases iniciais de terapias experimentais, na avaliação do impacto de procedimentos invasivos terapêuticos ou de monitoração, necessita de modelos experimentais de sepse (19,20,21), métodos versáteis em reproduzir a sepse nas suas mais variadas formas e níveis de gravidade, mas que não estão livres de crítica tanto do ponto de vista metodológico (22,23), quanto em considerações técnicas e éticas no manuseio dos animais de estudo (24) mas que representam importante ferramenta de estudo para sepse.

Este estudo avalia a possível ação da deficiência de tiamina sobre a sepse à luz de marcadores bioquímicos de inflamação (interleucinas), do equilíbrio do sistema de oxi-redução orgânico na forma da presença de um marcador de peroxidação de lipídeos de membrana e do perfil de migração celular de leucócitos, com a hipótese de que a deficiência de tiamina nas condições experimentais de sepse possa determinar um perfil pró-inflamatório, com uma maior expressão de estresse oxidante e migração celular.

Esta dissertação apresentará inicialmente uma revisão da literatura com a apresentação de conceitos e discussão epidemiológica sobre a sepse, o papel da tiamina, os mecanismos de inflamação e o equilíbrio oxi-redutor, seguidos pela apresentação dos objetivos do trabalho. Em materiais e métodos, serão abordados temas sobre o manejo dos animais teste, procedimentos cirúrgicos, determinações bioquímicas e contagens celulares e bacterianas. Por fim, os resultados serão discutidos e as conclusões apresentadas tendo em vista as contribuições sugeridas e horizontes de futuros estudos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Sepses: definição e relevância

A sepse corresponde hoje à forma como compreendemos a repercussão da infecção no ser humano. Porém, até 1991, a falta de normatização quanto à nomenclatura, definições e critérios dificultava a comparação entre estudos e representava obstáculo no avanço da compreensão sobre a sepse. Tanto que em agosto de 1991 em Northbrook, no estado americano de Illinois, foi realizada uma conferência de consenso entre o *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM), que através da avaliação de experientes membros escolhidos, foi produzido um documento que continha a primeira normatização aplicada à sepse, bem como às suas gradações de gravidade e condições associadas (1).

O termo 'Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica' do inglês *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) foi cunhado para descrever a reação inflamatória sistêmica desencadeada pelo organismo frente a qualquer agressão infecciosa (causada por bactérias, fungos ou vírus) ou não-infecciosa (trauma, isquemia, queimadura, pancreatite, etc) (1) (Figura 1). Desde então, a sepse é definida como uma condição clínica resultante da resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro em vigência de infecção suspeita ou confirmada (1,2,3).

Enquanto a sepse pode ser definida como uma resposta inflamatória sistêmica frente a um quadro infeccioso, a sepse grave ocorre quando a sepse encontra-se associada à disfunção de pelo menos um órgão ou sistema (alteração da função cardíaca, hepática, renal, alteração de coagulação, etc). Já o termo choque séptico identifica quadro caracterizado por sepse com hipotensão arterial persistente e refratária à reposição hídrica adequada por via intravenosa, necessitando do uso de drogas vasoativas (1,2,3).

O quadro de SIRS deve ser considerado quando da presença de dois ou mais sinais entre os quatro grupos descritos a seguir: i) temperatura acima de 38°C ou abaixo de 36°C; ii) frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto; iii) frequência respiratória acima de 20 respirações por minuto, ou PaCO₂ menor que 32

mmHg e, iv) contagem de leucócitos no sangue acima 12.000/ mm³ ou abaixo de 4.000/mm³, ou mais de 10% de formas jovens (1).

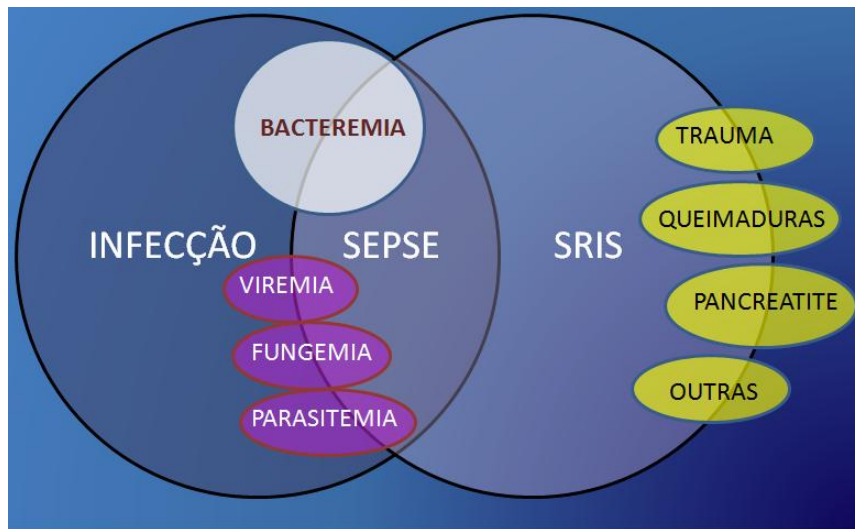


Figura 1 - Relação entre infecção, sepse e SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica), e agentes causais. Modificado de ACCP, 1992 (1).

Fica claro que tais critérios foram cunhados propositalmente mais sensíveis do que específicos, pois o objetivo era garantir que indivíduos com estados patológicos que levassem à SIRS em vigência de infecção não deixassem de ser englobados por esta classificação, uma vez que a sepse foi compreendida como um verdadeiro problema emergente de saúde pública mundial, tendo em vista a sua prevalência, elevadas morbidade e letalidade associadas, além de redução da expectativa de vida de pacientes que sobrevivem às suas formas graves, com elevado custo para os sistemas de saúde.

De acordo com revisão realizada por Engel e colaboradores (4) inúmeros estudos têm sido publicados sobre a epidemiologia da sepse, com utilização de diferentes abordagens metodológicas, tais como estudos de coorte prospectivos, estudos transversais, ou através de análises retrospectivas de prontuários. A incidência e a letalidade da sepse, obtidas a partir destes estudos epidemiológicos, mostram, de forma não surpreendente, uma variação considerável.

Estudo alemão (4) aponta no primeiro dia de internação em terapia intensiva prevalência de sepse de 12,4%, e de 11% para sepse severa e choque séptico, com mortalidade geral de 48,4%. Segundo Zahorec e colaboradores (5), aproximadamente de 10 a 25% dos pacientes críticos que necessitam de admissão

em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) encontram-se com sepse em unidades da Eslováquia.

A sepse representa uma das maiores causas de morte em pacientes clínicos graves e vítimas de politraumatismo, no contexto da terapia intensiva, com uma incidência anual nos EUA de 751.000 casos (3 casos/1.000 habitantes) e evolução geral para óbito em 28,6% dos casos (6).

No Brasil, a qualidade da base de dados, dos registros e prontuários, problemas quanto à notificação, entre outros, configuram um desafio à coleta de dados de qualidade para a avaliação de doenças, não sendo diferente para a sepse, cujos dados ainda são subestimados, mas já contamos com informações importantes, com destaque para dois grandes estudos do ponto de vista epidemiológico.

Em 2006 (7), foram publicados os resultados da observação de 1383 pacientes sépticos, obtidos de cinco centros de terapia intensiva, ao longo de nove meses, sendo verificada incidência de 61,4 casos de sepse por 1.000 pacientes/dia, sepse grave de 35,6/1000, e choque séptico de 30,0/1000. A letalidade geral das UTI em 28 dias foi de 21,8%. A letalidade foi crescente para pacientes com: SIRS (24,3%), sepse (34,7%), sepse grave (47,3%) e choque séptico (52,2%). O principal foco infeccioso nos pacientes foi o pulmonar (65,6%), seguido de foco indeterminado (21,4%), foco urinário (5,6%), abdominal (4,9%) e infecção de corrente sanguínea (2,5%).

Um novo estudo (8) com 3.128 pacientes, alocados em setenta e cinco unidades de terapia intensiva de todo o país, observou que 16,7% foram identificados como tendo sepse, sepse grave e choque séptico. A mortalidade global em 28 dias foi de 46,6%. As letalidades na sepse, sepse grave e choque séptico foram de 16,7%, 34,4% e 65,3%, respectivamente. Os custos envolvidos são elevados no tratamento de pacientes em terapia intensiva com sepse.

Muitos fatores contribuem para o aumento da incidência da sepse. Entre eles pode-se destacar o aumento da expectativa de vida da população mundial, o aumento do número de procedimentos invasivos para diagnóstico e monitoramento de pacientes em estado grave, a emergência de microorganismos resistentes a antibióticos, e o número crescente de pacientes imunodeprimidos, como os portadores de neoplasias, os transplantados, os pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida. Condições crônicas debilitantes, como o diabetes

mellitus, o alcoolismo e a desnutrição, também são causadoras de predisposição às infecções (3,6,7,8,9,10). A causa infecciosa da sepse pode ser originada por agentes biológicos como as bactérias (gram-negativas e gram-positivas), fungos e vírus. As bactérias gram-positivas e gram-negativas são as responsáveis pela maioria dos casos da sepse, variando de 36% e 47%, respectivamente (7,8,9). Um estudo brasileiro (11) aponta um custo médio de cerca de 900 dólares por dia de tratamento de cada paciente séptico.

A letalidade de sepse grave/choque séptico no Brasil está entre as maiores do mundo, razão pela qual o Ministério da Saúde brasileiro lançou, em abril de 2012, o programa “Brasil contra a sepse”. Mais de cem hospitais de ensino brasileiros estão participando, com aplicação de protocolo de tratamento que vem demonstrando, em países desenvolvidos, capacidade de reduzir a letalidade dessa condição clínica (12).

1.2 Tiamina

A primeira menção científica a respeito de quadro clínico de beriberi pode ser atribuída ao médico da marinha japonesa Takaki Kanehiro (1849-1920) que observou sua elevada incidência entre militares da marinha japonesa, quadro esse atribuído à alimentação. Mais tarde, o médico holandês Christiaan Eijkman (1858-1930) observa, em galinhas, paralisia de membros inferiores, e observa a recuperação dos animais com acréscimo de casca de arroz à alimentação das aves. Um bioquímico polonês, Casimir Funk (1884-1967) observou na casca de arroz, a presença de uma substância com grupamento amino, cunhando o termo **vitamina**, algo como amina vital. Junto à Eijkman, Adolphe Vorderman (1844-1902) progrediu na observação da relação nutricional desta doença e por suas contribuições no estudo das vitaminas recebem o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1929 (13).

A tiamina (vitamina B1) é uma vitamina hidrossolúvel que não se acumula no organismo, tendo, portanto, que ser ingerida diariamente. Suas principais fontes naturais são: carnes vermelhas, cereais integrais e ovos. Sabe-se hoje que existem substâncias que degradam a tiamina, as chamadas tiaminases, enzimas termolábeis presentes em mariscos e peixes de rio, podendo ser um fator importante em

indivíduos com ingestão frequente destes alimentos, quando crus. Além disso, dietas ricas em carboidratos, o consumo de álcool e cafeína, entre outros fatores como o uso de diuréticos de alça e a hemodiálise, podem provocar a depleção de tiamina. Na célula, a tiamina é rapidamente convertida em pirofosfato de tiamina (PPT), que é a forma biologicamente ativa da vitamina (Figura 2), formada pela transferência de um grupo pirofosfato do ATP à tiamina (13).

O PPT age no equilíbrio energético celular, através do metabolismo de glicose, atuando como cofator na mitocôndria no complexo piruvato desidrogenase, que, pela descarboxilação oxidativa do piruvato oriundo da glicólise, produz o acetato ativo e a acetil coenzima A (acetil-CoA), que é um dos componentes principais da via metabólica do ciclo de Krebs. Também é cofator do complexo mitocondrial da alfa-cetoglutarato desidrogenase (α -KGDH) também componente do ciclo de Krebs (13,14,15).

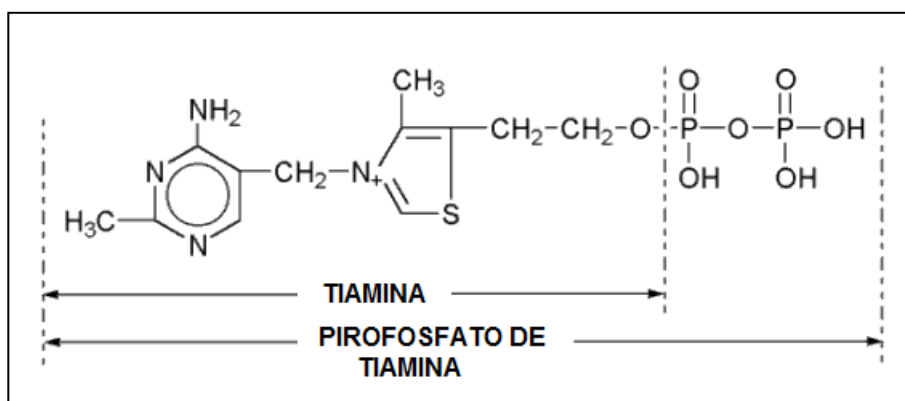


Figura 2 - Fórmula estrutural da tiamina e do pirofosfato de tiamina.

Desta forma, a deficiência de tiamina decorre em grave desequilíbrio energético celular com deficiência na síntese de fosfatos de alta energia, acúmulo de piruvato, que será convertido ao lactato, um fator contribuinte para a condição de acidose metabólica, principalmente em vigência de choque e disfunção hepática, uma vez que a produção hepática de glicose a partir de lactato, o ciclo de Cori, ocorre de forma inadequada nessas condições clínicas.

Na via das pentoses fosfato a PPT é cofator da transcetolase, que gera nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), necessária à

recuperação de glutatona oxidada (GSSG) à glutatona reduzida (GSH), o principal sistema de proteção celular frente a agentes oxidantes de alta reatividade, como as espécies reativas de oxigênio (ERO). Outro aspecto relevante é a produção de ribose, e conseqüentemente de desoxirribose, nessa via, substratos fundamentais para a síntese dos ácidos nucleicos (13,15,16,17,18) conforme visto na figura 3.

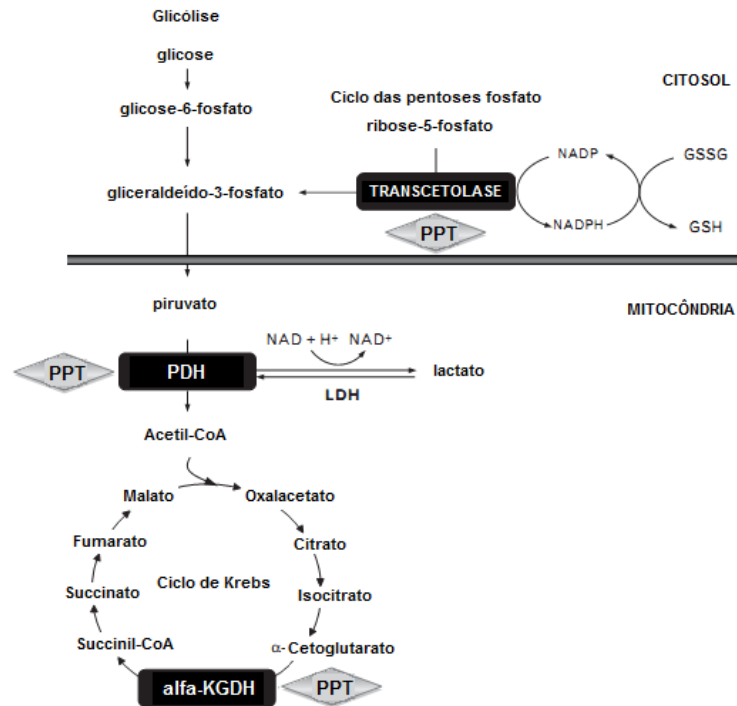


Figura 3 - Localização das enzimas dependentes de tiamina na via glicolítica, na via das pentoses fosfato e no ciclo de Krebs. Modificado de Manzanares, 2011 (17).

1.3 Modelos experimentais de sepse

A utilização de modelo experimental é uma ferramenta útil na tentativa da reprodução dos fenômenos que ocorrem no organismo durante a sepse. Permite o estudo fisiopatológico de modo controlado e reprodutível, manejando fatores de risco, proteção e tratamentos, uma vez que as limitações éticas para humanos não permitiriam essa abordagem.

Vários são os modelos propostos: injeção de produtos bacterianos como lipopolissacarídeos ou mesmo patógenos viáveis em sangue, órgãos e cavidades, reproduzindo meningite, pneumonia, peritonite, etc (19,20,21). O modelo de ligadura e perfuração de ceco já está estabelecido há mais de 30 anos (19). É especialmente útil por apresentar além de inóculo bacteriano em cavidade previamente estéril a evolução de uma lesão tecidual local (perfurações da alça cega formada a partir do ceco), que se assemelha a uma peritonite provocada por inflamação e perfuração de uma víscera abdominal oca (estômago, apêndice, divertículos de Meckel e cólon) (19,21).

Porém não há modelo de sepse livre de crítica. Diferenças entre espécies, a idade dos animais utilizados, a perícia do executor dos procedimentos necessários para a instalação da sepse, estão entre os principais pontos de crítica (22,23). Além disso, considerações éticas também devem ser respeitadas, tanto na manutenção e nutrição de animais de experimentação, bem como na sua manipulação, nos procedimentos anestésicos, cirúrgicos e de sacrifício dos animais de acordo com avaliação do comitê de ética em uso de animais de experimentação da instituição acadêmica envolvida. No Brasil devem ser respeitadas as diretrizes definidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – SBCAL/COBEA (24).

1.4 Marcadores de resposta inflamatória

Em condições de sepse, são observados no organismo hospedeiro, eventos locais e sistêmicos, vasorreativos, circulatórios, imunológicos (celulares e humorais), associados à tentativa de expulsar o patógeno e recuperar as células e tecidos (Figura 4) ou suas funções, eventualmente danificados (25,26,27). A compreensão das relações entre tais mecanismos pode explicar a extensão do processo, bem como, a severidade do quadro clínico expresso pelo hospedeiro. A avaliação de interleucinas (IL) 24 horas após indução da sepse, proposta neste estudo, analisa um cenário de transição, já ao fim das reações da via inata da imunidade, onde IL-1 e TNF- α já foram produzidas por macrófagos, para as reações da via adaptativa da imunidade, já com produção regulatória de IL-10 por monócitos.

Diante de uma condição de estresse biológico como trauma ou mesmo associado à infecção, a primeira reação do organismo será através da via da imunidade inata, um conjunto de reações “primitivas” do ponto de vista filogenético, não específica no que diz respeito ao alvo, ambientada nas primeiras horas da interação hospedeiro/patógeno, com a participação da inflamação, de proteínas de fase aguda e o sistema complemento. Do ponto de vista celular, temos a ação de fagócitos como células dendríticas, macrófagos e células *natural killer* (NK) (27,28,29).

Tais células têm a capacidade de se ligar a componentes expressos em agentes capazes de provocar infecção, como vírus, parasitos, bactérias, etc, os chamados padrões moleculares associados a patógenos ou PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*), sendo, contudo, componentes estranhos às células do hospedeiro (30,31,32). Uma vez em contato com patógenos, estes são fagocitados, digeridos e alguns componentes próprios destes agentes, são expressos na superfície dessas células de defesa (chamadas células apresentadoras de antígenos, do inglês *antigen-presenting cell* - APC, apresentando-os para linfócitos que irão deflagrar a resposta da via adaptativa da imunidade e retroalimentar a própria resposta inata. As APC se encontram principalmente no trato respiratório, na pele e no aparelho digestório, principais portas de entrada de microorganismos (25,28,29).

Quando o macrófago entra em contato com patógenos fica ativado e passa a produzir TNF- α , responsável pelo aumento da permeabilidade vascular por ação nas células endoteliais, além de estimular o próprio macrófago a produzir IL-6, que junto à IL-1 β tem papel decisivo na gênese da febre, por ação no centro hipotalâmico de controle de temperatura (25,29). Macrófagos ativados passam a expressar uma forma indutível de óxido nítrico sintase (iNOS) e produzir NO que participa dos mecanismos de aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, que são características hemodinâmicas da sepse (27,29).

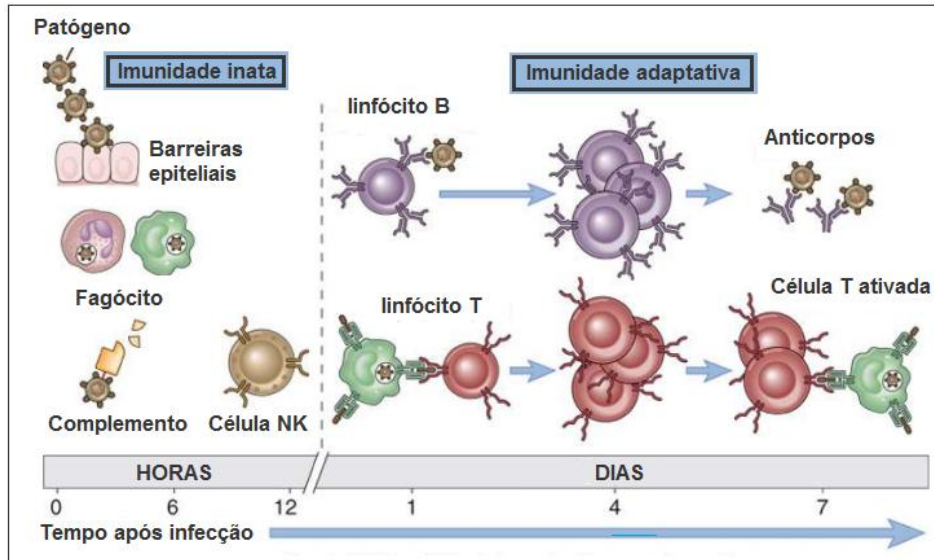


Figura 4 - Sumário da resposta imunológica inata e adaptativa. Modificada de Abbas, 2003 (27).

As células NK são ativadas após contato com patógenos, produzindo interferon γ (INF- γ) um potente ativador de macrófagos. Também mecanismos humorais estão envolvidos como a ativação de componentes do sistema complemento que recobrem esses patógenos facilitando o reconhecimento e fagocitose por parte de macrófagos e neutrófilos (27,28).

1.5 Estresse oxidante

Os organismos que necessitam de oxigênio para viver o consomem durante as reações da respiração celular. Durante esse processo, elétrons são liberados e recebidos pelo oxigênio, que por fim é reduzido à água. (30,31,32). Isso gera moléculas de oxigênio carregadas com elevado potencial reativo. Esse processo é necessário, mas, para que moléculas de oxigênio carregadas não permaneçam “livres” podendo atacar e danificar estruturas biológicas adjacentes (componentes de membranas citoplasmáticas, DNA, etc), são necessários mecanismos de retirada dessas espécies reativas de oxigênio (ERO) (30,31,32).

O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. O não-emparelhamento de elétrons da última camada confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (30,33). Esses radicais livres com elétron desemparelhado podem ocorrer nos átomos de oxigênio ou nitrogênio. A tabela 1 apresenta compostos de alta reatividade, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Os radicais livres de oxigênio são formados em um cenário de reações de óxido-redução, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto, estes radicais ou provocam ou resultam das reações de óxido-redução (30,32).

Nos organismos, os radicais livres são gerados nas células durante a sua produção de energia, participam da eliminação de microorganismos fagocitados, da regeneração tecidual através da regulação da apoptose, e da síntese de substâncias biológicas importantes, entre elas o óxido nítrico (30). A produção excessiva dessas espécies pode levar à indução de danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, e podem levar à morte celular (33,34).

Tabela 1 - Agentes de alta reatividade derivados de oxigênio e de nitrogênio, produzidos por reações biológicas.

Radicais livres	Não radicais
Espécies reativas de Oxigênio	
Superóxido ($\bullet O_2$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Hidroxila ($\bullet OH$)	Ácido hipocloroso (HClO)
Hidroperoxila ($\bullet OOH$)	
Peroxila ($\bullet ROO$)	
Espécies reativas de Nitrogênio	
Óxido nítrico ($\bullet NO$)	Peroxinitrito (ONOO)
Dióxido de nitrogênio radical ($\bullet NO_2$)	Ácido peroxinitroso (ONOOH)

Na medida em que as ERO são formadas, mecanismos de retirada dessas moléculas dos tecidos, principalmente o sistema glutaciona (GSH), são ativados com o propósito de controlar o processo, prevenindo que esses intermediários do oxigênio danifiquem estruturas, como os constituintes proteicos e lipídicos da

membrana citoplasmática e o DNA. Isto permite um equilíbrio entre a formação e a retirada de ERO, podendo ser chamado de equilíbrio redox, inicialmente através dos sistemas enzimáticos da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (30,32,33,34).

No momento em que este equilíbrio se desfaz a sobra de ERO e/ou a incapacidade de ação eficiente dos sistemas enzimáticos SOD/CAT e, principalmente, do sistema glutathiona reduzida/ glutathiona oxidada (GSH/GSSG) vai determinar lesão celular em vários alvos, como já citado. Um dos personagens que tem recebido atenção da literatura recentemente é o 4-hidroxi,2-nonenal (4-HNE), um aldeído derivado da peroxidação lipídica de constituintes da membrana citoplasmática, que além de ser marcador de dano oxidante ocorrido, tem sido considerado também como agente de lesão celular (33,36,37).

Inicialmente acreditava-se que o acúmulo de produtos de peroxidação como o 4-HNE era obrigatoriamente lesivo aos tecidos. Mais recentemente, já se sabe que de acordo com o tecido ou órgão envolvido, a presença de 4-HNE é necessária e participa, por exemplo, de processos de sinalização celular e da ativação do processo de reparação celular de cardiomiócitos (38,39).

A glutathiona (GSH) é um composto tripeptídico formado pelos aminoácidos glutâmico, cisteína e glicina pela ação da glutathiona sintetase. A GSH faz parte do que é considerado o principal sistema de biotransformação e eliminação de xenobióticos e de defesa das células contra o estresse oxidante (31,33,40,41). Em relação ao consumo de ERO, a GSH é conjugada ao peróxido de hidrogênio pela glutathiona peroxidase (GPx) e conjugada pela glutathiona S transferase (GST) com aldeídos como o 4-HNE. A recuperação no organismo da forma dissulfeto oxidada (GSSG) à forma reduzida (GSH) é realizada pela GST (40,41).

1.6 Relação entre tiamina, resposta inflamatória e estresse oxidante

A literatura nos apresenta algumas evidências de agravo do processo inflamatório e de lesão celular frente à deficiência de tiamina em vários tecidos. Em condição de deficiência de tiamina podemos esperar alteração funcional

mitocondrial, com mau funcionamento das reações da cadeia respiratória e desequilíbrio energético (16).

A deficiência de tiamina resulta em consequências bem definidas de alteração funcional celular no SNC, como estudo sobre a memória em animais (42), na encefalopatia de Wernicke (16,43), além de evidências de alteração da barreira hematoencefálica devido a acidose láctica local, ação sobre a glia em especial sobre os astrócitos com aumento da inflamação local e consequente morte neuronal (16, 43,44). Essa deficiência no tecido cerebral simula os achados histopatológicos próprios dos chamados modelos de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (43,44,45,46).

Em relação ao coração, a deficiência de tiamina tem comprovada ação deletéria sobre a função cardíaca já definida (47,48), com alterações mitocondriais (49,50) em consequência de remodelamento tecidual (38,39,45,50), com alterações eletrofisiológicas (51) e com evidências em microscopia eletrônica de alteração em cardiomiócitos.

Em nível subcelular a deficiência de tiamina já apresentou alguns alvos, como a alteração do retículo endoplasmático de neurônios (52), a lesão mitocondrial como vacuolização e destruição da arquitetura das cristas mitocondriais, observadas em células cardíacas de animais privados de tiamina (49,50) e em culturas de neurônios de neuroblastoma humano (53). As alterações mitocondriais tem recebido cada vez mais atenção, uma vez que há atualmente provas da associação entre alteração mitocondrial, estresse oxidante e progressão de doenças (54,55) contexto já observado na sepse (56).

Da mesma forma, a determinação da deficiência de tiamina como uma condição frequente em pacientes graves no ambiente de terapia intensiva é cada vez mais encontrada (38,40,47) e já com sugestão de que essa deficiência pode estar associada a um pior desfecho, de acordo com um estudo recente envolvendo 202 crianças internadas em unidade de terapia intensiva onde foi observada deficiência de tiamina associada a aumento de mortalidade (57).

Em uma recente revisão são apresentados dados de vários estudos relacionando a diminuição da concentração plasmática de substâncias reconhecidas como anti-oxidantes, como as vitaminas C e E, associados ao aumento de marcadores de estresse oxidante com uma maior evolução para disfunção orgânica múltipla em pacientes sépticos (58).

O estudo da deficiência de tiamina no contexto de sepse representa um tema cada vez mais abordado. Merece destaque um trabalho de 1989 onde foi induzida sepse em cães por endotoxemia, com observação da recuperação de marcadores de perfusão e cardiovasculares nos animais sépticos tratados com PPT (59), o que sugere que o *status* de tiamina pode afetar um indivíduo séptico, uma condição habitual em pacientes na terapia intensiva. Tanto que já começam a surgir estudos sobre a suplementação de tiamina em pacientes graves (60,61,62).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência da deficiência de tiamina sobre a resposta inflamatória, o estresse oxidante e a migração celular em modelo experimental de sepse.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os níveis sanguíneos normais de PPT em camundongos c57/bl6, machos entre 6 e 8 semanas.
- Avaliar o tempo necessário para a instalação de deficiência de tiamina em camundongos c57bl6 submetidos à alimentação com ração pobre em tiamina.
- Avaliar a influência da deficiência de tiamina sobre a resposta inflamatória em camundongos c57bl6 sépticos, através da avaliação de interleucinas séricas.
- Avaliar a influência da deficiência de tiamina sobre o estresse oxidante em fígado de camundongos c57bl6 sépticos, através da formação de proteínas modificadas pelo 4-HNE.
- Avaliar o perfil celular de leucócitos no sangue periférico e no lavado peritoneal após 24 horas de sepse desses animais.
- Avaliar o *clearance* bacteriano através da recuperação de bactérias viáveis por cultura de líquido peritoneal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manuseio dos animais de experimentação

O presente estudo foi apresentado ao comitê de ética para o uso de animais em pesquisa do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - IBRAG – UERJ, sendo aprovado com laudo nº CEUA/036/2011, com validade até 01/09/2015.

Foi escolhido o camundongo c57bl6 como animal de teste para o presente estudo, sendo mantidos até 5 animais por caixa, em ambiente de temperatura controlada a $24^{\circ} \text{C} \pm 2$, com fotoperíodo claro de 12 horas, com livre acesso à água e ração.

3.2 Manejo dietético preliminar dos animais no primeiro experimento

Por não ter encontrado na literatura a concentração média normal de tiamina para camundongos, assim como de seus derivados fosforilados, como a PPT, foi inicialmente conduzido um experimento com o objetivo de definir a concentração média normal de PPT, bem como, o momento a partir do qual o camundongo apresenta deficiência de tiamina quando submetido à ingestão de ração pobre em tiamina, uma vez que se trata de uma vitamina que não é armazenada em grande quantidade, o que facilita a ocorrência de deficiência, caso sua ingestão seja inadequada.

Foi feito acompanhamento e comparação da ingestão de ração AIN93G completa e com ração em tudo idêntica a essa, porém pobre em tiamina, bem como da evolução da massa corporal desses animais, para verificar a ocorrência de diferença na ingestão entre os dois grupos de animais. Desta forma, a massa dos animais foi aferida na chegada ao biotério, ao fim dos sete primeiros dias com dieta completa (período de aclimatação e uniformização na ingestão de tiamina), no início da dieta pobre em tiamina, e a partir do 10º dia (data do sacrifício do primeiro grupo privado de tiamina) a cada 5 dias.

O período de 25 dias foi sugerido originalmente esperando um perfil similar ao do rato Wistar, que desenvolveu a deficiência de tiamina entre 20 e 25 dias após a ingestão da ração pobre em tiamina (49). Nesse mesmo estudo observou-se que com o passar do tempo, os animais com ração pobre em tiamina apresentavam uma ingestão progressivamente menor de ração, o que poderia criar um viés, na medida em que estariam também ingerindo menos proteína ou calorias, por exemplo, o que poderia ter repercussão no desfecho (49).

Uma alternativa para impedir esse viés é executar o chamado *pair-feeding*, onde a quantidade de ração oferecida para cada animal do grupo controle segue a média de consumo dos animais alimentados com ração pobre em tiamina de modo a uniformizar a ingestão dos nutrientes para todos os animais, diferindo apenas na oferta de tiamina.

As rações utilizadas, uma completa e outra sem adição de tiamina, foram adquiridas de Pragsoluções Biociências Ltda, Jaú – SP, sendo escolhido para ambas, o padrão AIN93G (63) adequado a animais jovens da espécie utilizada, que ainda não atingiram a maturidade sexual.

A evolução do consumo médio de ração pelos camundongos c57bl6 foi determinada a partir da medida de massa de ração oferecida para cada caixa, independente se a AIN93G completa ou a similar sem tiamina, ao longo do experimento, no dia zero, 10º dia, 15º dia e 20º dia, calculada a média de consumo em gramas por dia para cada animal. Nas mesmas datas foram aferidas as massas corporais dos animais, de modo a calcular a média de ganho de massa em gramas por dia para cada animal.

3.3 Determinação do tempo necessário para a indução de deficiência de tiamina

Para a definição do tempo necessário para obter deficiência de tiamina (experimento 1) planejou-se, inicialmente, experimento conforme apresentado na Figura 5, com 25 camundongos c57bl6, machos, entre 6 e 8 semanas, divididos em cinco grupos de 5 animais cada. Todos os animais receberam ração AIN93G completa, por um período de 7 dias para uniformizar a ingestão de tiamina. A seguir,

4 grupos, receberam dieta AIN93G pobre em tiamina, programando-se que cada grupo de animais seria sacrificado respectivamente após 10, 15, 20 e 25 dias do início dessa dieta. Um quinto grupo, com ingestão de dieta AIN93G completa, chamado de grupo controle, foi sacrificado após o fim dos 7 primeiros dias.

Quando do sacrifício, foi coletada amostra de sangue de cada animal por punção cardíaca, com heparina, para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), visando a determinação da concentração média de PPT nos animais em cada período de privação da ingestão de tiamina. Foi arbitrado como deficiente em tiamina o grupo que apresentasse concentração de PPT dois ou mais desvios padrão abaixo da média da concentração dos animais alimentados com ração AIN93G completa. As amostras de sangue foram imediatamente identificadas e congeladas a -20°C .

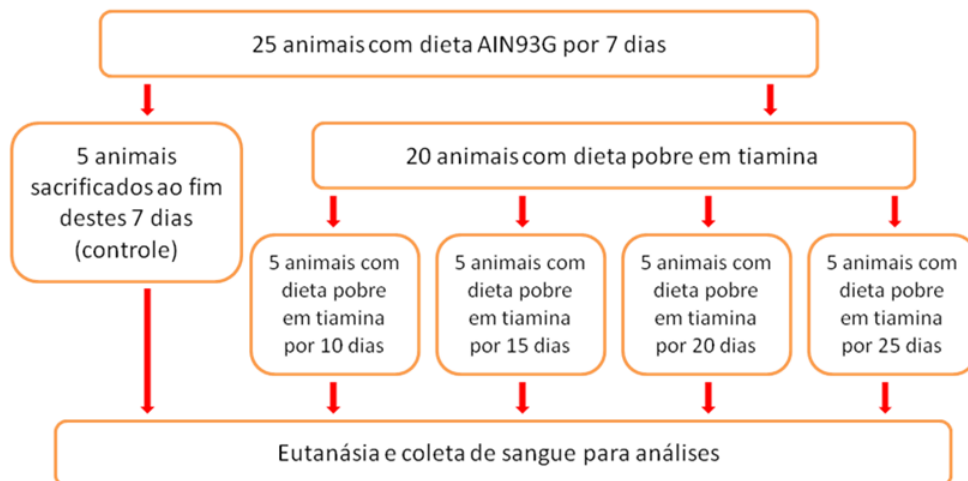


Figura 2 - Desenho do Experimento 1 para a determinação do número de dias necessários para instalação de deficiência de tiamina nessa espécie, com a ração pobre em tiamina usada nesse estudo.

3.4 Procedimento de sepse experimental (CLP)

Para o experimento envolvendo sepse (experimento 2), quarenta camundongos c57/bl6 foram alimentados com ração padrão AIN-93G por 7 dias. Em

seguida foram divididos em dois grupos: 20 animais permaneceram ingerindo a mesma ração, e os demais foram alimentados com ração AIN-93G pobre em tiamina, os dois grupos por 15 dias. Passado esse período todos os animais foram anestesiados e submetidos à laparotomia, sendo que a metade com CLP (Figura 6).

Após 24 h, todos os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia, sendo coletado sangue por punção cardíaca (em seringa com heparina sódica) e recolhidos os fígados. As amostras de sangue foram imediatamente identificadas e congeladas à -20° C e os fígados congelados em nitrogênio líquido à -196° C.

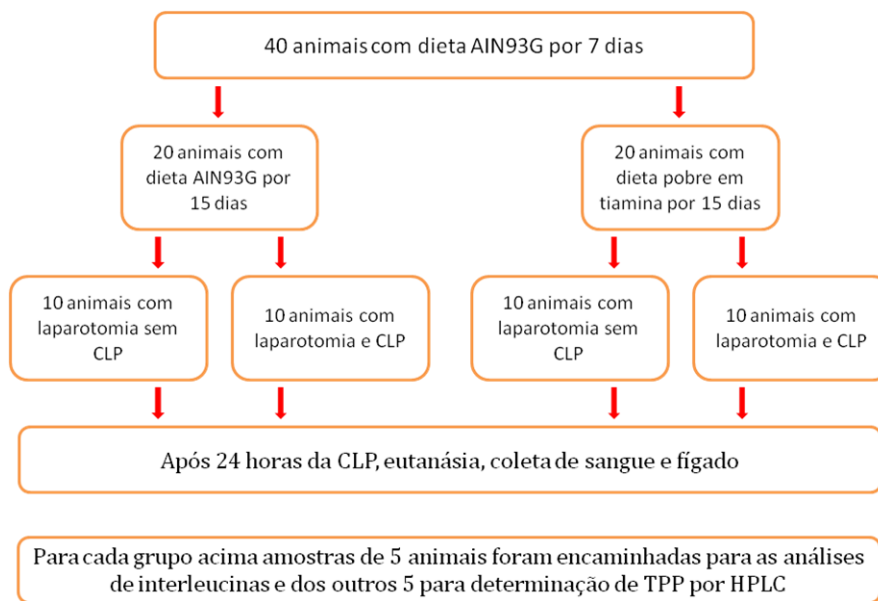


Figura 3 - Desenho do experimento 2 onde o modelo de sepse é CLP (ligadura e perfuração de ceco).

3.5 Anestesia e procedimentos cirúrgicos

3.5.1 Procedimento de CLP

A analgesia e anestesia prévias aos procedimentos cirúrgicos foram realizadas por injeção intraperitoneal, com ketamina e xylazina, respectivamente nas concentrações finais de 65mg/kg e 13mg/kg, em solução salina 0,9%, a partir das seguintes apresentações comerciais: ketamina como Dopalen[®] 10% (VetBrands do

Brasil) e xylazina como Anasedan[®] 2% (VetBrands do Brasil). Foram injetados da solução anestésica em média 200 µL por animal de cerca de 20g.

Foi realizada a antissepsia da pele com álcool 70% e a seguir, por pinçamento da pele, incisão cutânea medial e longitudinal de cerca de 2 a 3 centímetros, seguida de pinçamento e incisão do peritônio, sendo afastadas as alças intestinais e identificado o ceco. Este foi ligado com fio de sutura nº 4.0 de nylon, junto ao terceiro arco vascular incompleto, a partir da extremidade, tomando-se o cuidado de não interromper o trânsito dessa alça.

A alça cega formada foi cuidadosamente perfurada 2 vezes com agulha 18 Gauge e comprimida para a saída de pequena quantidade de fezes pelas perfurações. Por fim, as alças foram recolocadas na cavidade peritoneal, com sutura do peritônio e da parede abdominal com fio nº 4.0 de nylon (Figura 7). Imediatamente após o processo cirúrgico foi feita a administração de 0,5 ml de salina 0,9% estéril, por via subcutânea para reposição volêmica, e umidificação de cada olho com soro fisiológico 0,9%. Por fim, cada animal foi devolvido a sua caixa com livre acesso à água e ração (15,64).

3.5.2 Eutanásia e recolhimento de sangue e fígado

Após vinte e quatro horas da realização da CLP, os animais foram levados para a capela de fluxo e novamente anestesiados, conforme descrito anteriormente, para a coleta de sangue por punção cardíaca subxifóide na linha média, com agulha 21 Gauge em seringa heparinizada, com a retirada de sangue que foi conservado em gelo e estocado a -2°C (64).

A eutanásia foi realizada por nova injeção do dobro da quantidade de anestésico calculado para cada animal. Um volume de 2 mL de salina estéril (NaCl 0,9%) foi injetado no peritônio do animal e a seguir seu abdome foi delicadamente massageado por cerca de 1 minuto. Nova punção foi realizada para recuperação de alíquotas de lavado peritoneal. (64).

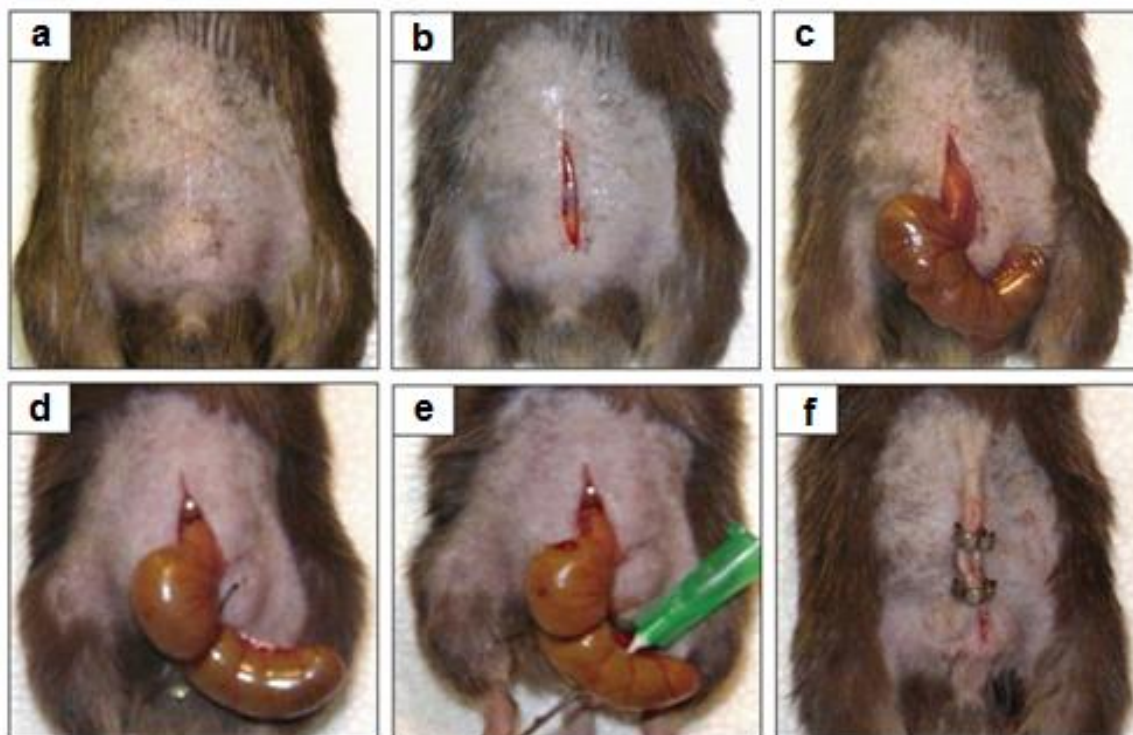


Figura 4 - Etapas do procedimento CLP. Onde: a) após anestesia intraperitoneal o abdome é preparado com raspagem de pelos e feita antissepsia local com álcool 70%; b) incisão mediana de cerca de 2 cm da pele e a seguir do peritôneo; c) identificação e exposição do ceco; d) ligadura do ceco antes da valva ileocecal formando alça cega; e) perfuração da alça cega; f) recolocação do ceco na cavidade e fechamento da incisão com recomposição em planos. Modificado de Rittirsh, 2007(23).

O abdome foi novamente aberto com ampliação da ferida operatória para facilitar a retirada do fígado que foi inicialmente conservado em gelo e estocado em criotubos no nitrogênio líquido (-196° C) para a análise de 4-HNE.

3.6 Determinação de PPT em HPLC por fluorimetria

A detecção de PPT foi realizada por modificação de metodologia previamente descrita (49,65,66) onde amostra de sangue (volume conhecido) heparinizado (14UI/mL) foi congelada em nitrogênio líquido, descongelada em temperatura

ambiente, sofrendo vibração em agitador por 15 segundos, processo que foi executado 3 vezes, visando a hemólise. Em seguida foi feita a desproteinização com ácido tricloroacético (TCA) 40%, usando 12,5% do volume da amostra (ex.: 600 μ L de amostra + 75 μ L de ácido tricloroacético 40%) (49).

Seguiu-se repouso por 1 hora em temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida foi feita centrifugação em centrífuga de eppendorff, a 14.000 rcf, por 30 minutos. O sobrenadante da amostra resultante foi recolhido, o volume foi medido e o TCA foi extraído com o uso de éter etílico saturado em água. Este foi produzido adicionando-se partes iguais de éter etílico e água ultrapura, obtida através do sistema mili-Q[®]. Utilizou-se volume de éter etílico saturado em água cinco vezes o volume da amostra (ex.: 200 μ L de amostra + 1000 μ L de éter saturado em água) – misturando em agitador por 15 a 20 segundos. A amostra resultante, extraída da parte inferior da mistura com o éter, foi congelada a -70°C , para posterior análise por HPLC (49).

Na cromatografia 100 μ L da amostra foram submetidos à derivatização, para formação do derivado tiocromo, um composto excitável por fluorescência, a partir da reação do ferricianeto de potássio 30,4 nM junto com o hidróxido de sódio 0,8 M (ex.: amostra 150 μ L + 7,5 μ L (5%) de ferricianeto de potássio 30,4 nM e 7,5 μ L (5%) de hidróxido de sódio 0,8 M), imediatamente antes da aplicação na HPLC, que foi feita por microseringa de precisão de 100 μ L (49,65,66).

As corridas no HPLC foram executadas nas seguintes condições: fluxo 1,0 mL/min, comprimento de onda de excitação (λ_{EX}) 370 nm e comprimento de onda de emissão (λ_{EM}) 450 nm. A fase móvel foi isocrática, ou seja, com concentração do tampão constante, e correspondeu à solução de tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5 em acetonitrila 25%. Foi utilizado conjunto Hypersil Gold Amino (Thermo[®]) de coluna (250 x 4,6 mm, partícula de 5 μ m) e pré-coluna (10 x 4 mm) em sistema HPLC Shimadzu (Shimadzu Co. Kyoto, Japão), composto com bomba LC-10AD com válvula RF-535 e o método de detecção foi o de fluorimetria, baseado na excitabilidade do tiocromo à luz fluorescente (49,65,66).

Foi confeccionada curva de calibração de PPT que gerou a equação de conversão. Para isso, foi feita diluição seriada na razão 1:2 a partir de solução de 600 nM, produzindo portanto, soluções de concentração de 150 nM, 75 nM, 37,5 nM, 18,75 nM, 9,375 nM e 4,6875 nM. O cálculo integral da área sob o pico

cromatográfico foi relacionado à concentração injetada, definindo assim diferentes concentrações baseadas na área do pico das amostras biológicas analisadas.

3.7 Detecção de 4-HNE por western blot

No primeiro dia foi preparado o gel de poliacrilamida para eletroforese, colocando 10 µL por poço, sendo no primeiro amostra de padrão de peso molecular conhecido, e nos seguintes amostras do ensaio. Após correr o gel, foi realizada a transferência para a membrana por 2 horas, com tensão constante de 100 V na geladeira ou isopor com gelo. Foi desmontado o sistema e corada a membrana com Ponceau S diluído dez vezes para visualizar as bandas, e a seguir feita cópia fotográfica em scanner. Em seguida, a membrana foi descorada com TBS-TWEEN e bloqueada com TBS-TWEEN-ALBUMINA 5% por 1 hora na geladeira (em agitador de placas de ELISA), retirando totalmente a solução de bloqueio. A seguir foi acrescentado o anticorpo primário, que ficou em incubação por cerca de 12 horas na geladeira, sob agitação contínua (67).

No dia seguinte, o anticorpo primário foi recolhido e congelado e a membrana lavada cinco vezes com TBS-Tween, 5 minutos em cada vez, em agitador. Foi então incubado o anticorpo secundário por 1 hora à temperatura ambiente no agitador. Foi retirado o anticorpo secundário, e a membrana foi lavada 5 vezes com TBS-Tween, 5 minutos em cada vez, em agitador. Então, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS, 5 minutos em cada vez, em agitador, tendo todo o TBS retirado, ficando a membrana pronta para a revelação.

Em câmara escura, ainda com a luz acesa, o revelador e o fixador foram colocados nas cubas apropriadas. A luz branca foi apagada e após 3 minutos a luz vermelha foi acesa. Então, a caixa de filme foi aberta, e uma folha foi retirada e cortada no tamanho da membrana. A membrana foi manipulada com a pinça e colocada entre as transparências, dentro do cassete e junto ao filme por 30 minutos. O filme foi mergulhado no revelador e quando apareceram as bandas, lavado com água e colocado no fixador. Por fim, lavado novamente com água da pia e posto

para secar. O filme revelado foi fotografado em scanner e as bandas comparadas entre os grupos, em relação à formação de adutos de proteínas com o 4-HNE (67).

3.8 Dosagem de citocinas e quimiocinas

As dosagens de TNF- α , IL-1, MCP-1/CCL2, IL-6 e KC foram realizadas através da técnica de ELISA, de acordo com método próprio para anticorpos murinos (64), utilizando-se anticorpos monoclonais específicos (Duo set kit – R&D systems[®]). Para essas análises foi utilizado o protocolo da Pharmingen, onde, placas de 96 poços (Nunc[®]) foram revestidas com anticorpos de captura. As placas foram cobertas e incubadas em torno de 16 horas na geladeira.

No dia seguinte, após 3 lavagens com PBS/Tween 20, as placas foram bloqueadas com PBS/BSA 1%, para evitar as ligações inespecíficas. Após 1 hora de intervalo, as placas foram submetidas novamente a quatro lavagens, com o reagente específico, onde foram adicionadas concentrações para as curvas-padrão, bem como as amostras (plasma ou lavado peritoneal). Novamente foram incubadas por 16 horas na geladeira.

No último dia, após lavagem, os anticorpos de detecção conjugados com biotina foram adicionados, deixando-se por mais 1 hora. As lavagens foram feitas novamente e o substrato (avidina-peroxidase) foi colocado para incubação por cerca de 30 minutos. Em seguida, o revelador (OPD) foi adicionado. A leitura foi feita em leitora de placa de Elisa a 450 nm. Os dados foram analisados através do programa Soft Max Pro, com as dosagens baseadas nas respectivas curvas-padrão (64).

3.9 Contagem de leucócitos em sangue periférico

A contagem total de leucócitos em sangue periférico foi realizada em câmaras de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 10x), após diluição (40x) das mesmas em solução de Türk. Já a contagem diferencial de leucócitos em sangue periférico foi realizada por técnica de esfregaço em lâmina seguido de coloração

pelo método May Grunwald-Giemsa e realizada sob objetiva de imersão em citoesfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin3- Shandon – 450 rpm por 5 minutos). A quantificação de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células.

3.10 Contagem de leucócitos em lavado peritoneal

A contagem total de leucócitos do lavado peritoneal foi efetuada em câmaras de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 1000x), após diluição (40x) das mesmas em solução de Türk. A análise diferencial de leucócitos foi realizada sob objetiva de imersão em citoesfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin3-Shandon – 450 rpm por 5 minutos), corados pelo método May Grunwald-Giemsa. A quantificação de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células.

3.11 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em lavado peritoneal

A alíquota do lavado peritoneal obtida para a contagem de CFU passou por diluição 1:50 em PBS estéril, sendo a seguir semeadas em placas de Petri com meio de cultivo TSA. Então as placas semeadas foram incubadas à 37° C por 24 horas para ao fim destas ter o número de UFC contado. Todo o procedimento foi feito sob condições estéreis (64).

3.12 Análise estatística

Foi utilizado o two way ANOVA para analisar as diferenças entre os grupos dos valores bioquímicos, imunológicos e celulares, com pós-teste de Sidak de modo

a realizar análise por comparação múltipla entre as variáveis, bem como para avaliar a contribuição de cada variável no resultados. O software utilizado foi o Prism versão 6.00 versão para Windows, Software GraphPad, São Diego, CA, USA. O nível de significância foi fixado em 0,05 (68).

4 RESULTADOS

4.1 Evolução do consumo de ração e massa corporal dos animais

O consumo médio de ração AIN93G completa por camundongos c57bl6 foi crescente ao longo do primeiro experimento. Já o consumo médio de ração similar a anterior, mas deficiente de tiamina, foi significativamente menor no 20º dia (Figura 8). O ganho de massa corporal dos animais alimentados com ração AIN93G completa foi crescente ao longo do primeiro experimento (Figura 9).

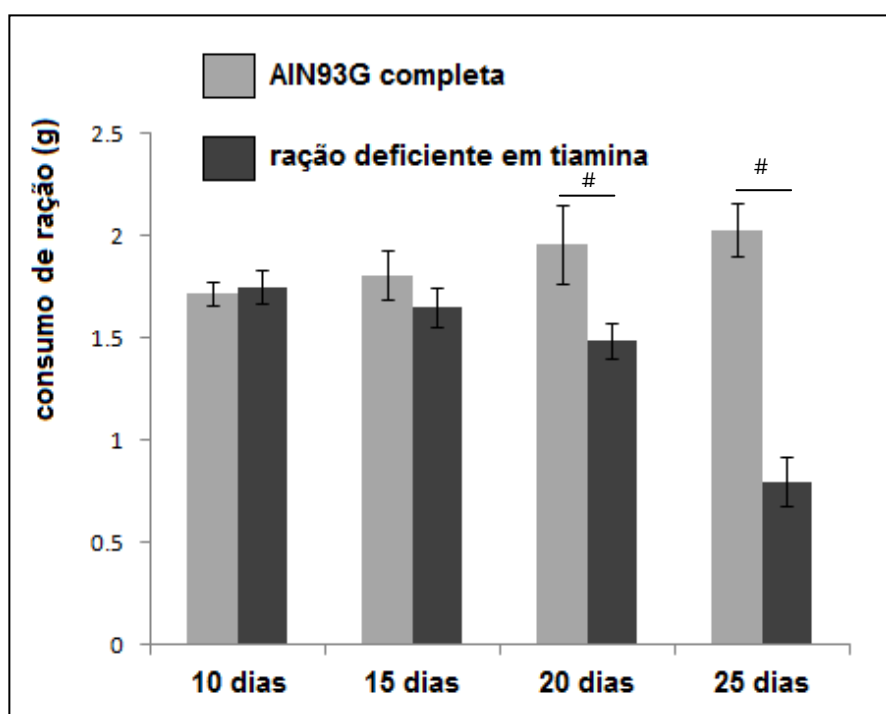


Figura 8 - Evolução do consumo médio de ração (AIN93G completa e ração deficiente de tiamina), do 10º, 15º, 20º e 25º dias do primeiro experimento. Foi observada diferença significativa de consumo a partir do 20º dia.

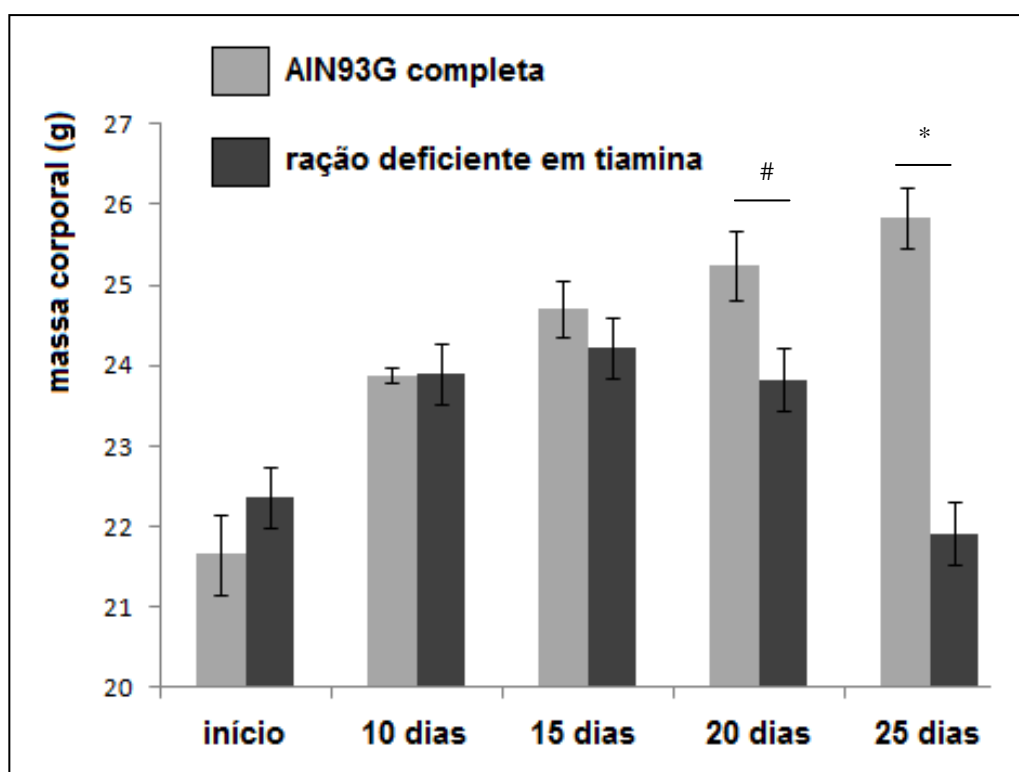


Figura 9 - Evolução da massa corporal dos camundongos alimentados com ração AIN93G completa e ração deficiente em tiamina, respectivamente, entre o início do experimento e 25^o dia. Foi observada diferença entre as rações no 20^o e 25^o dias.

4.2 Determinação do tempo necessário para a indução de deficiência de tiamina

No sangue dos camundongos a concentração média e o desvio padrão de PPT observados nesse estudo nos animais alimentados com ração AIN 93G completa foram de $303,3 \pm 42,6$ nM. Nos grupos alimentados com dieta AIN93G pobre em tiamina, as concentrações de PPT foram de $11,93 \pm 2,71$ nM para 10 dias de privação, e de $5,01 \pm 1,48$ nM para 15 dias de privação (Figura 10). O limite de detecção de PPT por HPLC observado nesse estudo foi de 4,68 nM.

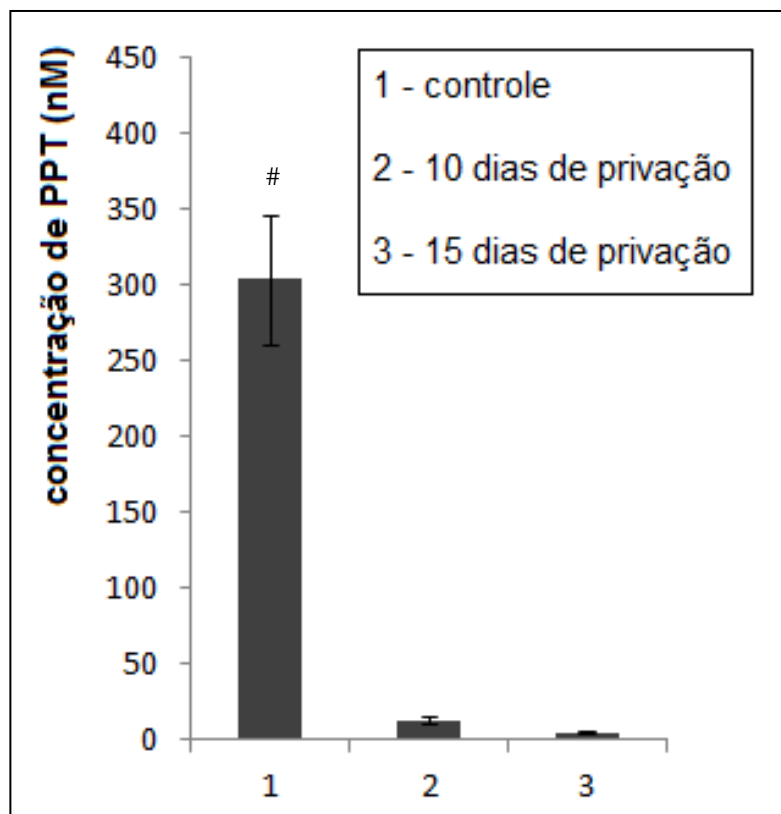


Figura 10 - Média das concentrações de PPT obtidas (com respectivos intervalos de confiança, IC 95%) para os grupos: (1) controle (#, diferente dos demais), (2) grupo com 10 dias de privação e (3) grupo com 15 dias de privação.

4.3 Níveis de tiamina no segundo experimento

No segundo experimento os níveis de tiamina, apresentados em média \pm desvio padrão, nos grupos SHAM ração completa, SHAM ração pobre em tiamina, CLP ração completa e CLP ração pobre em tiamina foram, respectivamente: $383,6 \pm 30,7$ nM, $376,9 \pm 24,3$ nM, $41,4 \pm 21,4$ nM e $40 \pm 13,7$ nM.

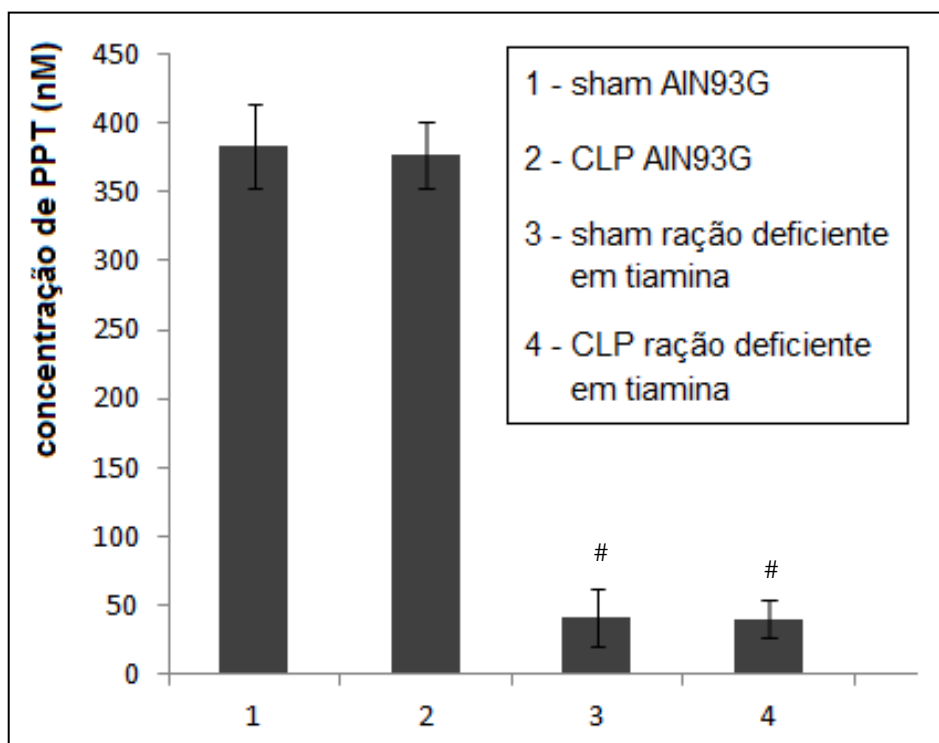


Figura 11 - Média das concentrações de PPT encontradas no segundo experimento, para os grupos: (1) sham AIN93G; (2) CLP AIN93G; (3) sham com ração deficiente em tiamina e (4) CLP com ração deficiente em tiamina. Grupos 3 e 4 (#) significativamente diferentes dos grupos 1 e 2.

4.4 Detecção de 4-HNE por western blot

O resultado da eletroforese bem como o controle de carregamento pode ser visto na figura 12. De acordo com as membranas obtidas no estudo, após análise com software para determinação da densidade óptica das bandas, foi possível observar que os animais dos grupos com ração pobre em tiamina apresentaram uma maior expressão de proteínas ligadas ao 4-HNE em relação aos animais com ração completa para $p < 0,0001$ (Figura 13).

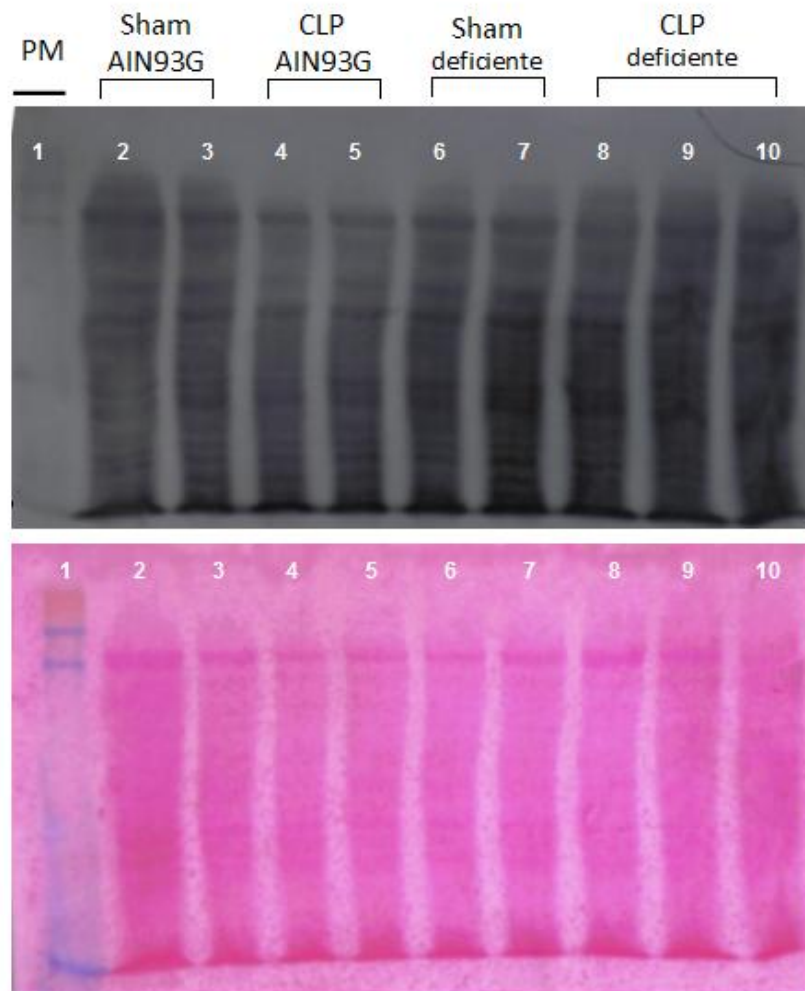


Figura 12 - Detalhes de bandas obtidas por western blot de fígado de camundongos c57bl6, para os grupos estudados (poços numerados de 1 a 10). Acima: exemplo de gel e abaixo: membrana correspondente corada com Ponceau S como controle de carregamento. PM: padrão molecular de massa no 1º poço.

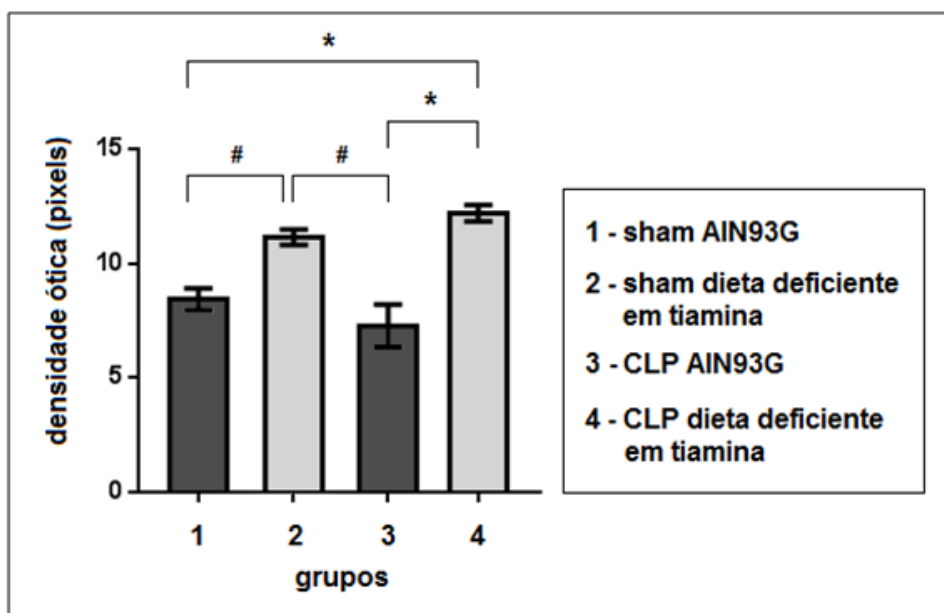


Figura 13 – Densitometria ótica de bandas para os grupos estudados. Apresenta diferença entre os grupos com ração deficiente em tiamina (com expressão mais elevada de 4-HNE em fígado, onde * e # tem $p < 0,0001$) e os demais.

4.5 Dosagem de interleucinas em sangue e lavado peritoneal

4.5.1 TNF- α

A concentração de TNF- α em sangue dos animais se mostrou semelhante entre os grupos. Em lavado peritoneal a concentração de TNF- α foi maior no grupo CLP deficiente em tiamina e significativamente diferente entre os demais grupos (Figura 14).

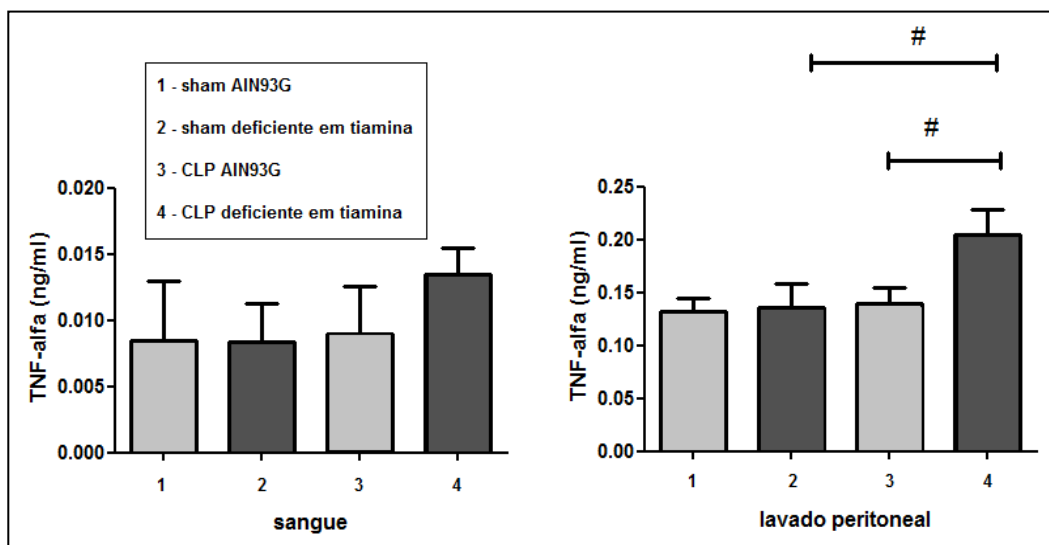


Figura 14 - Níveis de detecção de TNF- α em sangue e lavado peritoneal. A diferença ocorreu entre os grupos CLP ração completa e CLP ração deficiente em tiamina (# $p < 0,0012$).

4.5.2 IL-1 β

A concentração de IL-1 β em sangue dos animais se mostrou mais elevada nos grupos com ração completa com diferença em relação aos grupos com dieta deficiente em tiamina ($p < 0,0001$). No lavado peritoneal a concentração de IL-1 β foi maior nos grupos CLP sem diferença em relação à ração usada para $p = 0,001$ (Figura 15).

4.5.3 IL-6

A concentração de IL-6 em sangue dos animais foi significativamente mais baixa no grupo sham com dieta deficiente em tiamina do que nos demais, semelhantes entre si. No lavado peritoneal a concentração de IL-6 foi maior nos grupos CLP sem diferença em relação à ração usada (Figura 16).

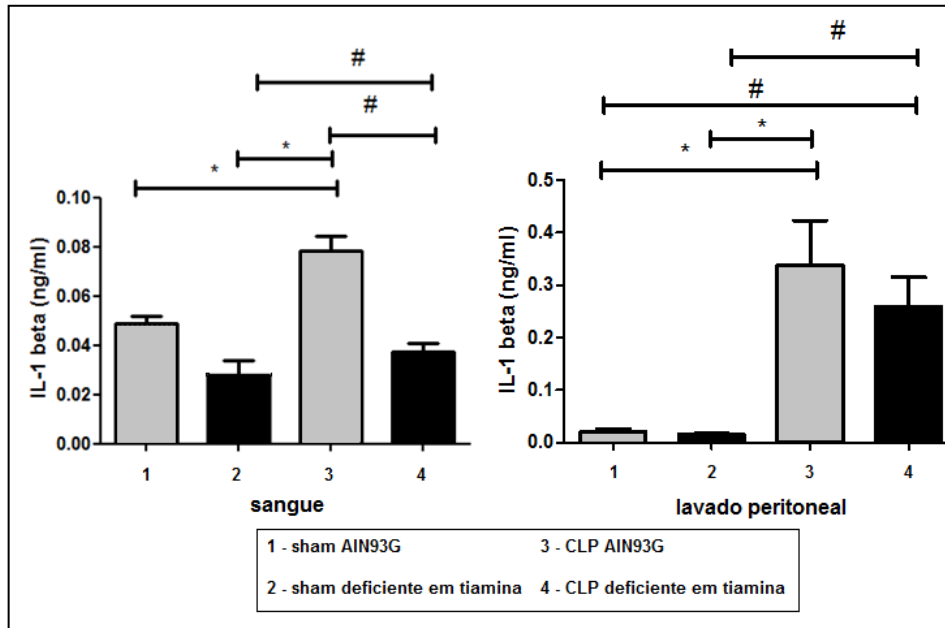


Figura 15 - Níveis de detecção de IL-1 β em sangue e lavado peritoneal com a diferença entre o grupo CLP ração deficiente em tiamina e os demais grupos(#), e entre o grupo CLP ração completa e os demais grupos(*).

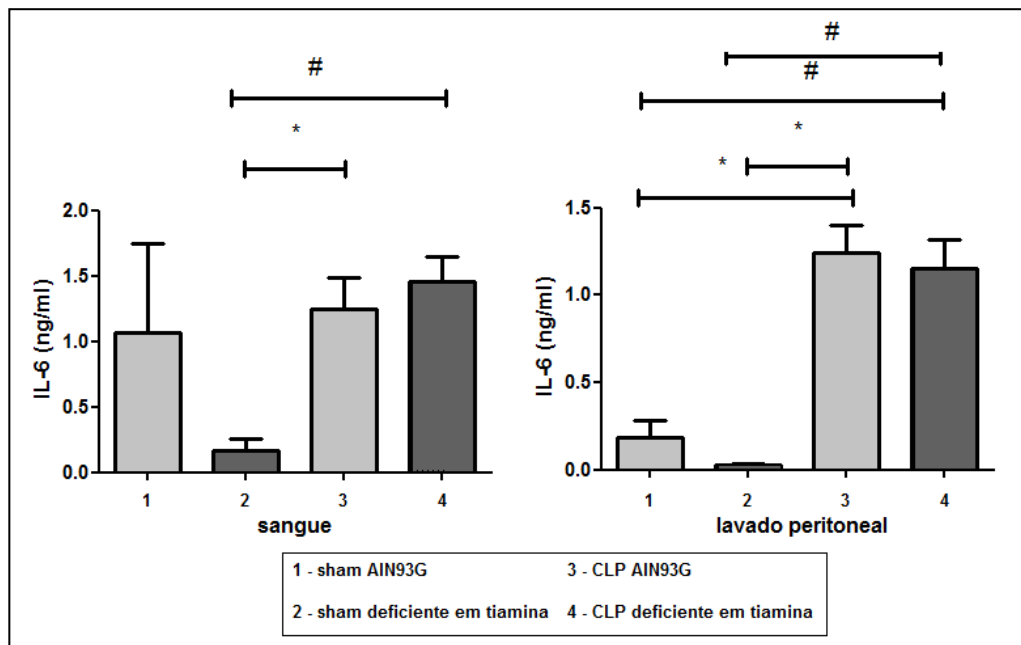


Figura 16 - Níveis de IL-6 no sangue e no lavado peritoneal com a diferença entre o grupo CLP ração deficiente em tiamina e os demais grupos(#), e entre o grupo CLP ração completa e os demais grupos(*)

4.5.4 MCP-1

A concentração de MCP-1 em lavado peritoneal dos animais foi significativamente maior nos grupos CLP do que nos demais, semelhantes entre si. (Figura 17). Tanto a CLP ($p < 0,0001$) quanto a deficiência de tiamina ($p = 0,0092$) contribuíram para a elevação de MCP-1 em lavado peritoneal.

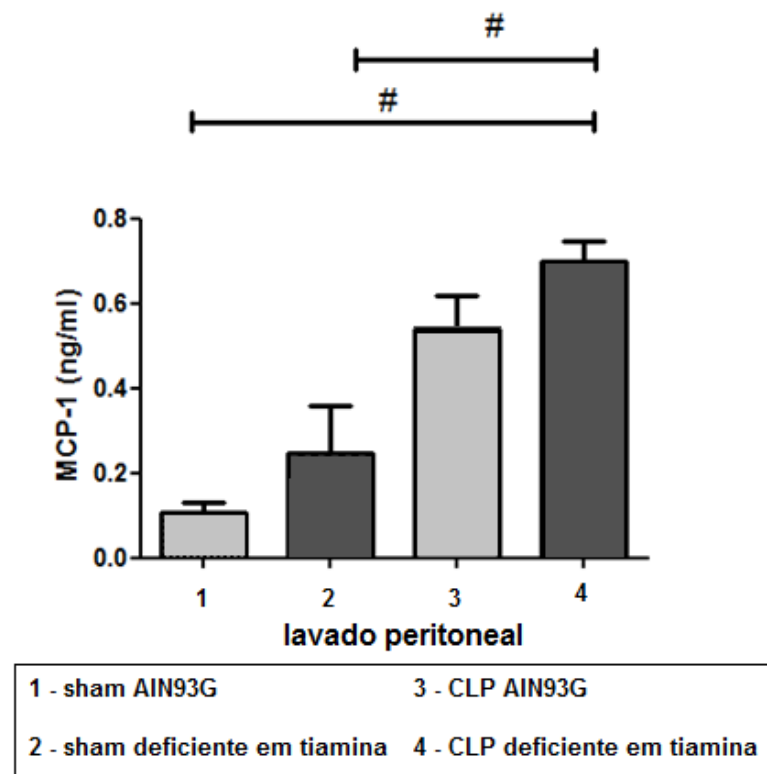


Figura 17 - Níveis de detecção de MCP-1 em lavado peritoneal com a diferença entre o grupo CLP ração deficiente em tiamina e os demais grupos (#).

4.5.5 KC

A concentração de KC em sangue dos animais foi significativamente mais baixa no grupo sham com dieta deficiente em tiamina do que nos demais, semelhantes entre si. No lavado peritoneal a concentração de KC foi maior nos grupos CLP sem diferença em relação à ração usada para $p < 0,0001$ (Figura 18).

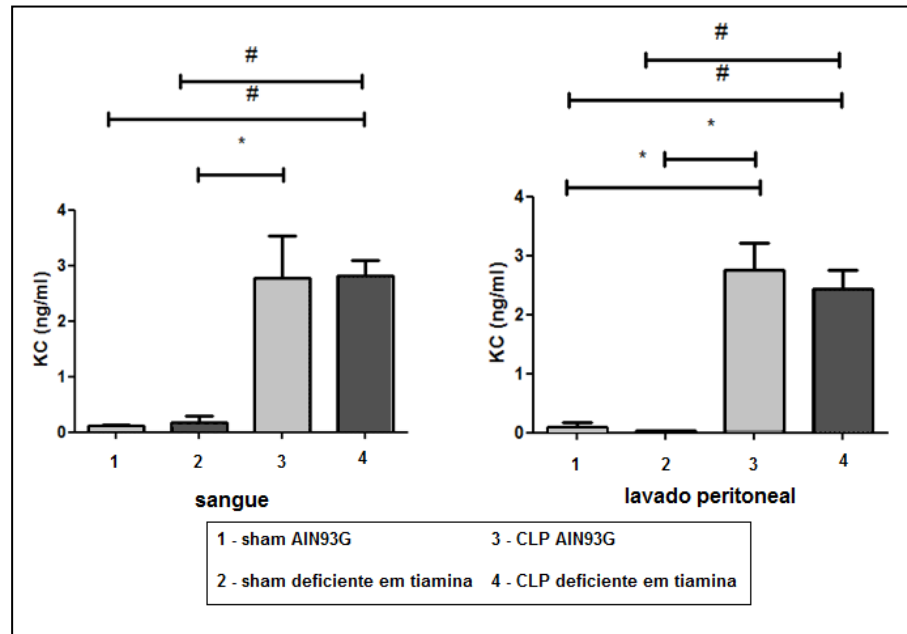


Figura 18 - Níveis de detecção de KC em sangue com a diferença entre o grupo CLP ração deficiente em tiamina e os demais grupos (#), e entre o grupo CLP ração completa e os demais grupos (*).

4.6 Contagem celular no sangue e lavado peritoneal

Na figura 18 pode-se observar a contagem de leucócitos totais, mononucleares e neutrófilos no sangue periférico dos animais, com diferença para a maior contagem de mononucleares no grupo CLP ração deficiente em tiamina em relação aos grupos com ração AIN93G completa. Na figura 19 está representada essa contagem no lavado peritoneal, onde se observa o aumento na contagem total e diferencial de leucócitos nos grupos CLP sem interferência do tipo de ração.

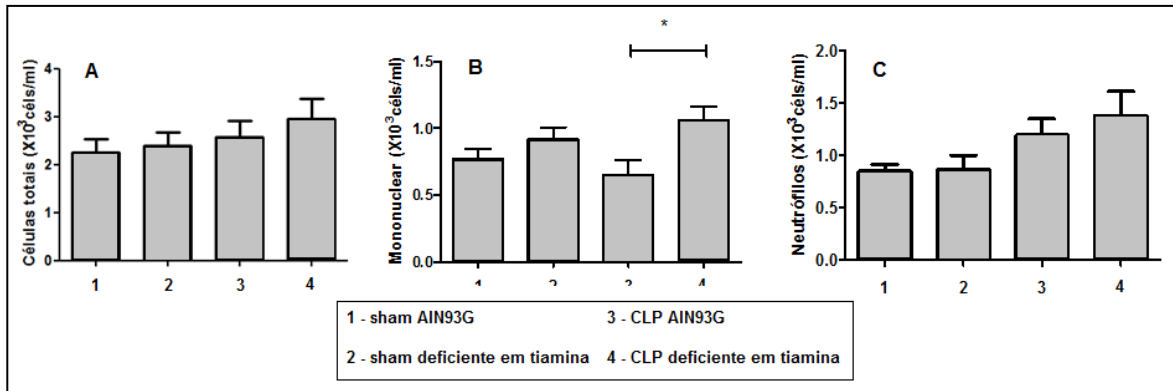


Figura 19 - Contagem no sangue periférico de glóbulos brancos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) para os grupos: SHAM ração completa, SHAM ração deficiente de tiamina, CLP ração completa e CLP ração deficiente de tiamina. * $p < 0,05$.

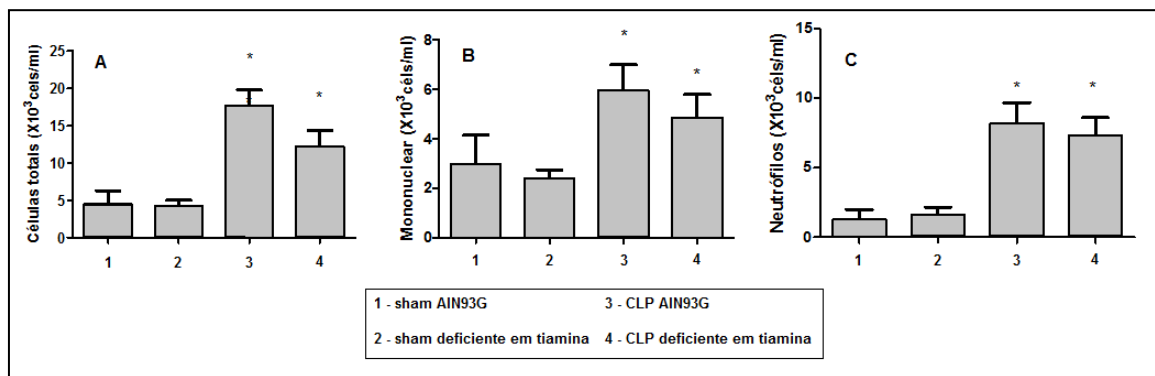


Figura 20 - Contagem no lavado peritoneal de glóbulos brancos totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C). As diferenças assinaladas (* $p < 0.05$) referem-se à comparação entre CLP ração completa e SHAM ração completa, e CLP ração deficiente e SHAM ração deficiente.

4.7 Recuperação bacteriana no lavado peritoneal

Os animais do grupo CLP AIN93G completa apresentaram uma elevada recuperação bacteriana em relação a todos os outros grupos, inclusive do grupo CPL com ração deficiente em tiamina, onde a recuperação foi equivalente aos animais dos grupos sham (Figura 21) demonstrando forte contribuição da deficiência de tiamina na menor recuperação bacteriana.

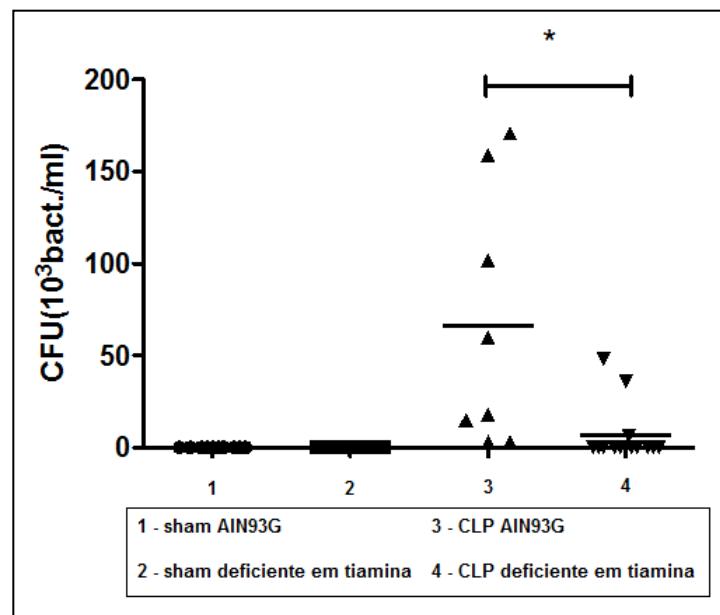


Figura 21 - Recuperação bacteriana no lavado peritoneal. Onde (*) representa existência de diferença significativa entre os grupos ($p=0,0041$).

5 DISCUSSÃO

Como há relato da associação entre deficiência de tiamina e hiporexia em ratos Wistar (49) foi planejado inicialmente o pareamento da oferta de ração entre o grupo privado de tiamina e àquele com ração completa. No entanto, como foi observado no primeiro experimento que a indução de deficiência de tiamina ocorreu já a partir do décimo dia de ingestão de ração pobre em tiamina, e que a queda na ingestão de ração ocorreu apenas a partir do vigésimo dia, não foi necessário o pareamento da ingestão de ração entre os grupos (pair-feeding), considerando que a CLP foi realizada no 15º dia de experimento. No entanto, observou-se diferença da massa corporal dos animais já a partir do 15º dia, o que confirma o que foi demonstrando no citado estudo.

Este estudo apresenta o nível sérico de PPT em camundongos c57bl6 alimentados com ração AIN93G, informação ainda não descrita na literatura.

A ração em tudo semelhante à AIN93G, porém deficiente em tiamina, foi capaz de induzir redução significativa dos níveis séricos da forma biologicamente ativa dessa vitamina, proporcionando a condição que se desejava estudar.

O presente estudo observou maior expressão no fígado de proteínas ligadas ao 4-HNE nos animais submetidos à alimentação com ração deficiente em tiamina, em relação aos demais grupos. Este achado já era esperado considerando que a deficiência de tiamina pode estar associada a uma menor eficiência do poder redutor celular (16,45,46).

Já houve tendência da literatura mundial de dar ao estresse oxidante um papel meramente nocivo ao organismo. No entanto, um número crescente de trabalhos aponta a participação de ERO e de componentes do estresse oxidante desempenhando importantes papéis na homeostase (38,39). A presença de nível aumentado de marcador de estresse oxidante não significa necessariamente presença de dano oxidante, equívoco observado em algumas publicações.

Estudo de Vemuganti *et al.* (44) observaram aumento da expressão no tecido cerebral de genes reguladores de interleucinas pro-inflamatórias, tais como IL-6, TNF- α , IL-18, interferons e quimiocinas tais como MCP-1, Gro 1, MIP-1 α e MIP-1 β , em contexto de deficiência de tiamina, o que esteve associado à quebra da barreira hematoencefálica, edema citotóxico e consequente morte neuronal (45). Esse último estudo também enfatiza o estímulo inflamatório secundário à acidose láctica, marco

metabólico da deficiência de tiamina. Outros autores têm enfatizado a associação entre deficiência de tiamina, estresse oxidante e inflamação no estudo de doenças neurodegenerativas (16,44,46).

O nível de TNF- α no lavado peritoneal dos animais submetidos à sepse e deficientes em tiamina foi significativamente maior que o observado nos demais grupos. Trata-se de uma citocina da fase inicial da resposta imune inata e inflamatória, produzida já na primeira hora, com pico entre a segunda e terceira horas de injúria, que pelo perfil muito precoce de expressão não costuma ser utilizada no acompanhamento de pacientes sépticos (69), pois estes ao serem avaliados podem já se encontrar fora desse período tão inicial.

No entanto, é um marcador precoce de resposta inflamatória, muito utilizado nos modelos de sepse (64). No presente estudo a deficiência de tiamina parece ter promovido uma persistência de níveis elevados desse marcador inflamatório no lavado peritoneal, o que pode contribuir para o agravamento da lesão local. Contudo, TNF- α é um marcador da atividade de células NK e macrófagos, e pode estar relacionado à maior morte bacteriana. A recuperação bacteriana observada no lavado peritoneal foi muito maior no grupo submetido à sepse e com ração completa em relação aos demais, tendo o grupo submetido à sepse e deficiente em tiamina uma recuperação bacteriana semelhante a dos grupos em que não foi induzida sepse.

Não houve diferença significativa no nível de IL-1 β no lavado peritoneal dos grupos submetidos à sepse, porém, no sangue, foi significativamente menor no grupo submetido à sepse e com deficiência de tiamina. Como consequência pode-se esperar menor ocorrência dos fenômenos sistêmicos da ação dessa citocina, tais como: febre, indução de síntese hepática de proteínas de fase aguda (69), indução de síntese de outras citocinas inflamatórias, metabólitos do ácido aracdônico e óxido nítrico (64,70). Em humanos os níveis sanguíneos elevados de IL-1 β estiveram relacionados com mortalidade precoce, em menos de 48 horas (71).

Observou-se que a sepse promoveu aumento nos níveis sanguíneos e peritoneais de IL-6, porém esses níveis não sofreram influência da deficiência de tiamina.

Os níveis de KC (agente quimiotático de neutrófilos) e MCP-1 (agente quimiotático de mononucleares) no sangue, e de KC no peritônio, não foram diferentes nos grupos sépticos.

A contagem de leucócitos totais, neutrófilos e monócitos em sangue e lavado peritoneal também não revelou diferença significativa entre os grupos submetidos à sepse, exceto um maior número de mononucleares no sangue dos privados de tiamina. Isto sugere não ter havido aumento significativo no recrutamento celular na cavidade peritoneal dos animais sépticos privados de tiamina. Cabe considerar, portanto, que outro mecanismo contribuiu para a existência de menor população bacteriana na cavidade peritoneal desse grupo. A maior expressão de proteínas ligadas ao 4-HNE no fígado do mesmo grupo de animais levanta a possibilidade de influência de um maior estresse oxidante na cavidade peritoneal como fator indutor de menor proliferação bacteriana. Isto poderia inicialmente sugerir uma melhor evolução desses animais frente à sepse, no entanto, estudo recente observou maior mortalidade dos animais que apresentaram menor recuperação bacteriana (72).

Dessa forma, a continuidade deste estudo com um teste de mortalidade e determinação de agentes oxidantes ou mesmo do desequilíbrio de agentes de remoção de ERO, pode acrescentar importantes informações quanto a uma possível associação entre estresse oxidante e maior mortalidade, o que pode apontar na direção de ser o estresse oxidante como o agente responsável pelo *clearance* bacteriano em cavidade peritoneal.

Vários outros horizontes se apresentam. A avaliação por imunofenotipagem das células peritoneais desses grupos, de modo a avaliar o perfil das diferentes populações celulares (macrófagos, neutrófilos, NK, mononucleares) pode esclarecer se ocorre possível influência da deficiência de tiamina sobre essas células e sugerir novas linhas de investigação. Na medida em que a literatura apresenta trabalhos que demonstram que a deficiência de tiamina pode ter como alvo células envolvidas no incremento da reação inflamatória local como as células da glia dentre elas células fagocitárias (44,45), é imperativo verificar se tais células com excelência para a fagocitose e, portanto para a apresentação de antígenos podem sofrer alguma alteração de função no contexto da deficiência de tiamina em relação à infecção e sepse.

Desta forma estamos lançando o olhar para os primeiros momentos da imunidade inata e para seus componentes tais como interleucinas, quimiocinas, células apresentadoras de antígenos, células NK, etc. Não se pode pensar em células apresentadoras de antígenos sem pensar no papel de receptores tipo toll

like, cruciais na interação precoce entre patógeno e hospedeiro e possíveis alterações no contexto de deficiência de tiamina.

A ampliação da análise de inflamação em outros momentos que não apenas 24 horas após a instalação de sepse pode apresentar um cenário mais completo da dinâmica das interleucinas e a relação com observação clínica dos animais de acordo com critérios de gravidade aplicados à animais teste.

É importante lembrar que o modelo de sepse utilizado pode e foi ajustado para um contexto de gravidade não tão intensa, logo o cenário deste estudo pode ser reproduzido com maior mortalidade e menor mortalidade o que pode demonstrar se existe participação da deficiência de tiamina com mecanismos de tolerância imunológica.

O papel da deficiência de tiamina em alteração cerebral está estabelecido e já existe evidência que com dano do ponto de vista de memória (42). Novos trabalhos vem sendo apresentados avaliando o déficit cognitivo após sepse, logo, a avaliação de possível associação entre deficiência de tiamina, sepse e déficit cognitivo pode apresentar contribuições importantes em relação à dinâmica dos efeitos cerebrais após sepse.

A exemplo do que já está estabelecido na literatura onde a deficiência de tiamina está associada ao aumento da apoptose em célula cardíaca (50) e aumento na produção de NO em SNC (16,45) cabe a análise desses agentes no contexto de sepse e deficiência de tiamina.

Dessa forma, muito há para avaliar e contribuir sobre a deficiência de tiamina em relação à sepse.

6 CONCLUSÃO

Camundongos c57bl6 sépticos deficientes em tiamina apresentaram, após 24 horas da indução da sepse, maior estresse oxidante no fígado e mudança na resposta inflamatória, caracterizada por maior nível de TNF α e MCP-1 no lavado peritoneal, menor nível de IL-1 β no sangue e maior número de mononucleares no sangue. Esse grupo de animais apresentou menor população bacteriana no lavado peritoneal. A sepse promoveu maior migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, porém não houve influência da deficiência de tiamina.

Camundongos c57bl6 alimentados com ração AIN93G apresentaram nível sanguíneo médio de PPT 303+42 nM, e quando alimentados com ração em tudo semelhante à AIN93G, porém sem adição de tiamina, apresentaram-se deficientes nessa vitamina no 10^o dia de ingestão dessa ração.

REFERÊNCIAS

1. AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE. Consensus conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992; 20: 864-874.
2. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med.* 2001; 345: 1368-1377.
3. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2008; 36 (1): 296-327.
4. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst r, Gerlach H, Grond S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. 2007; 33 (4): 606-618.
5. Záhorec R, Firment J, Straková J, Mikula J, Malík P, Novák I, et al. Epidemiology of severe sepsis in intensive care units in the Slovak Republic. *Infection.* 2005; 33 (3): 122-128.
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; 29: 1303-1310.
7. Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú AM, Cleovaldo TS, et al. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Rev. Brasileira Terapia Intensiva.* 2006; 18 (1).
8. Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2008; 8 (4): 251-260.
9. Soriano F, G. Sepsis: Celular, tissue and organ alterations in experimental model of sepsis. Role of cytokines and gene expression. 2006. 290f. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo.

10. Antonelli M, Bonten M, Chastre J, Citerio G, Conti G, Curtis JR, et al. Cardiovascular, infections, pneumonia and sepsis, critical care organization and outcome, education, ultrasonography, metabolism and coagulation. *Intensive Care Med.* 2011; 38 (3): 345–358.
11. Sogayar A. M. C; Machado F. R; Rea-Neto A; Dornas, A; Grion, C. M. C; Lobo, S. M. A. Prospective Study to Evaluate Costs of Septic Patients in Brazilian Intensive Care Units. *Pharmacoeconomics.* 2008; 26 (5): 425-434.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Brasil contra a sepse. Portaria nº 936/GM/MS, 2011. Ofício circular nº 0037/2012/CGHOP/DAE/SAS/MS, 27 de julho de 2012.
13. Tanphaichitr, V. Tiamina. In: SHILS, ME; OLSON, JA, SHIKE, M; CATHARINE, A. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 9ª ed. Editora Manole, 2002: 407-415, 1026 p.
14. Mclain AL, Szweda PA, Szweda LI. α -Ketoglutarate dehydrogenase: A mitochondrial redox sensor. *Free Radic Res.* 2011; 45 (1): 29–36.
15. Donnino MW, Carney E, Cocchi MN, barbash i, Chase M, Joyce N, et al. Thiamine deficiency in critically ill patients with sepsis. *JCritical Care.* 2010;25: 576 –581.
16. Hazell, AS. Butterworth, RF. Update of Cell Damage Mechanisms in Thiamine Deficiency: Focus on Oxidative Stress, Excitotoxicity and Inflammation. *Alcohol & Alcoholism,* 2007; 44 (2): 141–147.
17. Manzanares W & Hardy G. Thiamine supplementation in the critically ill. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011;14(6):610-617.
18. Andriantsitohaina R, Duluc L, García-Rodríguez JC, GIL-Del Valle L, Guevara-Garcia M, Simard G et al. Systems biology of antioxidants. *Clin Sci .*2012; 123 (3) 173-92.
19. Wicherman, K.A; Baue, A.E; Chaudry, I.H. Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980; 29 :189-201.
20. Remick, D.G & Peter, A. W. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock.* 2005; 24(1): 7–11.

21. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Loring W, RUE I, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005; 24 (1): 52–57.
22. Esmon, C.T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med*. 2004; 32:219–222.
23. Rittirsch, D; Hoesel, L.M; Ward A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J. Leukoc Biol*. 2007; 81:137-43.
24. Machado, C.J.S; Filipecki, A.T.P; Teixeira, M.O. Current Brazilian law on animal experimentation. *Science*. 2009; 324 (5935): 1643-1644.
25. Delves, R.P.J, Roitt, D. The Immune System - First of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343: 37-50.
26. Janeway, C.A, Medzhitov R. Innate immunity recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 197-216.
27. Abbas, A.K; Lichtman, A.H. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Saunders, 2003.
28. Cerwenka, A; Lanier, L.L. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2001; 1:41-49.
29. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 958-969.
30. Halliwell, B.R; Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed., Oxford: University Press, 1999.
31. Barreiros L.B.S, David, J.M, David, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Quím Nova*. 2006; 29 (1): 113-123.
32. Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 1997; 43 (1) 61-8.

33. Husain, S.R., J. Cillard & P. Cillard. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*. 1987; 26: 2489-2491.
34. Matsuo W, K. T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In Radák Z, editor. *Free Radicals in Exercise and Aging* Champaign: Human Kinetics, 2001.
35. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992; 59 (5) 1609-23.
36. Mclain AL, Szweda PA, Szweda LI. α -Ketoglutarate dehydrogenase: A mitochondrial redox sensor. *Free Radic Res*. 2011; 45 (1): 29–36.
37. Raza H, John A. 4-Hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S -transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 216 (2): 309-18.
38. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49: 576-86.
39. Sano, M. Cardioprotection by Hormetic Responses to Aldehyde. *Circ J*. 2010; 74:1787-1793.
40. Joseph D.; Mannervik, B.; Ortiz de Montellano *Molecular Toxicology*, 1st ed., Oxford University Press. New York 152-186, 1997.
41. Huber IPC, Almeida WP, Fátima A. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. 2008; *Quím. Nova*; 31(5):1170-1179.
42. Vigil FA, Oliveira-Silva IF, Ferreira LF, Pereira SR, Ribeiro AM. Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. *Behav Brain Res*. 2010; 210 (1):140-142.
43. Hirsch JA, Parrott J. New considerations on the neuromodulatory role of thiamine. *Pharmacology*. 2012; 89(1-2):111-6.

44. Vemuganti r, Kalluri H, Yi JH, Bowen KK, Hazell AS. Gene expression changes in thalamus and inferior colliculus associated with inflammation, cellular stress, metabolism and structural damage in thiamine deficiency. *European Journal of Neuroscience*. 2006; 23:1172-1188.
45. Jhala SS, Hazell AS. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: Consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochemistry International*, 2011; 58: 248–260.
46. Karuppagounder, SS, Xu H, Shi Q, Chen LH, Pedrini S, Pechman D, et al. Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model. *Neurobiol Aging* 2009; 30 (10): 1587-600.
47. Azizi-Namini P, Ahmed M, Yan AT, Keith M. The role of B vitamins in the management of heart failure. *Nutr Clin Pract*. 2012; 27(3): 363-74.
48. Mckeag NA, Mckinley MC, Woodside JV, Harbinson MT, Mckeown PP. The Role of Micronutrients in Heart Failure. *Journal of the academy of nutrition and dietetics*. 2012; 112 (6): 870-86.
49. Cunha S, Cunha, JB, Salles JB, Silva MC, Cunha Bastos VL, Mandarim-De-Lacerda CA. Cardiac alterations in furosemide-treated thiamine-deprived rats. *J Card Fail*. 2007; 13 (9): 774-84.
50. Gioda CR, Barreto TO, Prímola-Gomes TN, De Lima DC, Campos PP, Capettini LS et al. Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298: 2039-2045.
51. Wang Y, Cheng J, Chen G, Rob F, Naseem RH, Ngyen L, Johnstone JL, Hill JA. Remodeling of outward K⁺ currents in pressure-overload heart failure. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 2007;18(2): 869-875.
52. Wang X, Wang B, Fan Z, Shi X, Ke ZJ, LUO J. Thiamine deficiency induces endoplasmic reticulum stress in neurons. *Neuroscience*. 2007;144:1045–1056.
53. Wang JJL, Hua Z, Fentress HM, Singleton CK. JNK1 is inactivated during thiamine deficiency-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *J. Nutr. Biochem* 2000; 11: 208-215.

54. Youle RJ, Van Der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012; 31(337): 1062-1065.
55. Verri M, Pastoris O, Dossena M, Aquilani R, Guerriero F, Cuzzoni G, et al. Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012; 25 (2): 345-53.
56. Zang QS, Martinez B, Yao X, Maass DL, Ma L, Wolf SE et al. Sepsis-Induced Cardiac Mitochondrial Dysfunction Involves Altered Mitochondrial-Localization of Tyrosine Kinase Src and Tyrosine Phosphatase SHP2. *PloS one*, 2012 ; 7(8).
57. Lima LFP, Leite HP, Taddei JAAC. Low blood thiamine concentrations in children upon admission to the intensive care unit: risk factors and prognostic significance. *Am J Clin Nutr*. 2011; 93 (1): 57-61.
58. Andrades ME, Arian Morina A, Spasić S, Spasojević I. Bench-to-bedside review: Sepsis - from the redox point of view. *Critical Care*. 2011;15(5): 230.
59. Lindenbaum GA, Larrieu AJ, Carroll SF, Kapusnick RA. Effect of cocarboxylase in dogs subjected to experimental septic shock. *Crit Care Med*. 1989; 17(10) 1036-40.
60. Sriram K, Manzanares W, Joseph K. Thiamine in nutrition therapy. *Nutr Clin Pract*. 2012; 27(1) 41-50.
61. Schoenenberger, A. W; Schoenenberger-Berzins R; MAUR, C; Suter M; Vergopoulos, A; Erne M. Thiamine supplementation in symptomatic chronic heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over pilot study. *Clin Res Cardiol*. 2012;101:159-164.
62. Sarma S, Gheorghide M. Nutritional assessment and support of the patient with acute heart failure. *Current Opinion in Critical Care*. 2010;16: 413-418.
63. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey, JRGC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939–1951.
64. Gomes R. Potencial terapêutico da PAF acetilhidrolase (PAF-AH) no controle da sepse, 2006. Tese de doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Brasil, 2006.

65. Lynch L, Young, I.S. Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 2000; 881(1-2): 267-84.
66. Lu J, Frank EL. Rapid HPLC measurement of thiamine and its phosphate esters in whole blood. *Clin Chem.* 2008; 54 (5): 901-06.
67. Kurisaki E, Hiraiwa K. Western blot analysis for 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-modified proteins in paraquat-treated mice. *Legal Medicine.* 2009; 11: 431-433.
68. Zar, J. *Biostatistical analysis*, 4th ed. Upper Saddle River. Prentice Hall, 1999.
69. Bozza FA, Bozza PT, Faria-Neto HC. Beyond sepsis pathophysiology with cytokines: what is their value as biomarkers for disease severity? *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2005;100: 217-221.
70. Montón C, Torres A. Lung inflammatory response in pneumonia. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 1998; 53 (1) 56-63.
71. Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care.* 2007;11(2): 49.
72. Gomes RN. *Shock* 2012.

ANEXO – Termo de consentimento da Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/036/2011** sobre "**Efeito da deficiência de tiamina sobre o estresse oxidativo e a inflamação em modelos experimentais de sepsis**", sob a responsabilidade de **Sérgio da Cunha**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **01/09/2011**. Este certificado expira em **01/09/2015**.

Rio de Janeiro, 01 de Setembro de 2011.

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

*Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8*

Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8