

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**THIAGO VINICIUS ÁVILA**

**EFEITOS HEPÁTICOS DO FLUNIXIN MEGLUMINE EM  
ENDOTOXEMIA**

CURITIBA  
2009

**THIAGO VINICIUS ÁVILA**

**EFEITOS HEPÁTICOS DO FLUNIXIN MEGLUNINE EM  
ENDOTOXEMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra Acco

Co-orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

**CURITIBA  
2009**

## NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação é apresentada em formato alternativo – artigo para publicação – de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, constando de uma revisão de literatura, objetivos do trabalho e um artigo científico abordando os experimentos realizados, com resultados e discussão, além da conclusão. O Artigo foi formatado conforme as normas propostas pelo periódico “*Fundamental & Clinical Pharmacology*”, ao qual o artigo foi submetido em Junho de 2009.

DEDICO este trabalho aos maiores exemplos que tenho na minha vida, meus pais, José Geraldo e Maria Auxiliadora, pelo apoio incondicional em todas as situações, por não terem medido esforços para que hoje eu me tornasse quem eu sou. Aos meus queridos irmãos Alexandre e Gláucia pelo apoio e minha amada namorada Grazielly pelo seu companheirismo, sua torcida, suas palavras e seu amor. A todos vocês muito obrigado por sempre me darem forças, me apoiarem e confiarem em mim.

## AGRADECIMENTOS

À Deus eu glorifico, porque sei que se não fosse a sua misericórdia eu não estaria aqui. Deixo aqui algumas palavras que ouvi da sua parte.

***"Porque Nele foram criadas todas as coisas que há nos céus e na terra, visíveis e invisíveis... tudo foi criado por Ele e para Ele" Col. 1:16***

Ao longo desse trabalho eu pude conhecer um pouco mais da criação divina, do que se vê e também daquilo que é invisível aos nossos olhos. No início deste trabalho tudo era invisível, encoberto, mas ao fim, conhecemos mais dos segredos que são invisíveis aos nossos simples olhos. Agradeço a Ti por nos dar a oportunidade de conhecer as tuas obras, por revelar-las à humanidade. E saber que foram criados por ti e para se encontrar novamente contigo eternamente.

Aos meus pais, por sonharem junto comigo e acreditarem em mim, pelo apoio, pelo esforço, pelo amor que sempre recebi. Vocês são os maiores exemplos que tenho.

Aos meus irmãos Gláucia e Alexandre pela grande amizade e por sempre me receberem com um grande sorriso de felicidade quando eu voltava para casa, vocês são muito especiais para mim.

Agradeço a minha namorada Grazielly pelo seu apoio, por me entender e me ajudar a realizar esse trabalho mesmo nessa distancia tão grande Obrigado pelo seu amor.

À profa Dra Alexandra Acco, minha orientadora e amiga. Te agradeço infinitamente por acreditar em mim, em me receber em Curitiba e no seu laboratório com um grande sorriso e de braços abertos. Ter conhecido você foi uma grande bênção na minha vida, você é uma pessoa espetacular, com um coração enorme, bondosa e amiga. Aprendi muito com você, muito mais do que farmacologia somente, aprendi a ser uma pessoa mais justa e um profissional mais ético.

Ao prof. Aleksander Zampronio, meu co-orientador, que na ausência da Alexandra em Curitiba me recebeu com as portas abertas como seu co-orientado. Muito obrigado por toda ajuda durante a confecção do artigo, pelas dicas de apresentação em público, pelos ensinamentos de farmacologia e principalmente de inflamação, você é um excelente professor e é extremamente competente.

À Amanda pelos ensinamentos, pelos bons momentos de trabalho e pela amizade, Senti muito quando você defendeu e foi trabalhar. Você conseguia fazer os

experimentos ficarem mais divertidos. Torço muito por você e com certeza você merece muito.

À Adriana por me ajudar tanto nas técnicas de histologia e enzimas, pelo seu bom humor, e sua amizade. Aprendi muito com você, muito obrigado.

Aos amigos do laboratório: Daiana, Jonas, Bruna e Vanessa pela ajuda nos experimentos, Daiana e Bruna, obrigado pela disposição em ajudar no meu trabalho, sempre que precisei vocês estavam lá, mesmo a qualquer hora.

Agradeço aos amigos do departamento de farmacologia da UFPR pela amizade. À Sandra e a Yanna por me ajudarem no início no curso me apresentando as técnicas de CLP e pressão arterial.

Aos que entraram comigo na seleção do mestrado e que se tornaram bons amigos.

Agradeço ao prof. Dr. Adelar Bracht e a prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jorgete por me receber na UEM em Maringá de portas abertas no laboratório de metabolismo hepático. Obrigado por toda atenção e ensinamento.

Agradeço também aos técnicos do laboratório da UEM, Luiz, Cida e Irene, pela boa vontade em me ensinar, pelo suporte nos experimentos de perfusão hepática, muito obrigado a vocês.

Ao Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles, pela ajuda com as lâminas da Histologia.

Agradeço ao pessoal do laboratório da Gastro: Alexandra, Luisa e Francine, pela disposição em ajudar, pelos reagentes e equipamentos que sempre estiveram a nossa disposição, com certeza tudo seria muito mais difícil sem a amizade de vocês.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço de coração a todos vocês.  
Muito Obrigado!

## RESUMO

Estudos têm relatado que a sepse leva à morte de hepatócitos e ao comprometimento da função hepática, e o estresse oxidativo tem sido identificado como um fator importante no seu desenvolvimento. Vários antiinflamatórios não esteroidais (AINES) têm mostrado capacidade antioxidante *in vitro*, podendo atuar dessa maneira na sepse. Neste trabalho foi avaliado se o AINE flunixin meglumine (FM) pode ser útil nesta condição. Para tanto, foram analisados os efeitos do FM: (a) nos níveis plasmáticos de enzimas hepáticas; (b) nas alterações histológicas indicativas de dano hepático; (c) sobre a atividade de enzimas antioxidantes e lipoperoxidação; e (d) sobre o estudo do metabolismo da alanina na neoglicogênese, ureagênese e sobre o consumo de oxigênio pelos hepatócitos. Grupos tratados com solução salina ou FM, 1,1 ou 2,2 mg.kg<sup>-1</sup>, 2 h antes ou 2 h após a injeção de LPS foram avaliados. Níveis plasmáticos aumentados de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e alterações histológicas indicaram dano hepático durante a sepse. Além disso, a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) e os níveis de peroxidação lipídica no fígado foram aumentados, sugerindo que este dano hepático poderia estar relacionado também ao estresse oxidativo. O pré-tratamento dos animais com FM diminuiu estes parâmetros e aumentou a disponibilidade de glutathiona reduzida (GSH) no fígado durante a sepse. Verificou-se também que o FM tem atividade redutora do radical DPP+ *in vitro*. Além disso, o tratamento com FM antes da injeção de LPS normalizou a produção de glicose e recuperou parcialmente a ureagênese. O tratamento após a injeção com LPS apresentou-se menos efetivo, apesar de diferenças significativas terem sido observadas nos níveis enzimáticos, principalmente na maior dose de FM administrada. Estes resultados mostram que o LPS tem importantes efeitos no metabolismo hepático e no estresse oxidativo. Além disso, o FM demonstrou ação antioxidante e esta ação pode ser, em parte, responsável pela restauração da função hepática, preservando a integridade dos hepatócitos em estados de endotoxemia.

Palavras-chave: Endotoxemia, LPS, Flunixin Meglumine, Fígado, Estresse Oxidativo.

## ABSTRACT

Sepsis leads to the death of hepatocytes and impairment of liver function. Oxidative stress has been shown to play an important role on this condition. Although NSAIDs are not the suggested drugs for sepsis treatment, some of them have shown antioxidant capacity. The aim of the present study was to evaluate the actions of the NSAID flunixin-meglumin (FM) on the changes caused by LPS-induced sepsis in several parameters, such as: (a) plasma levels of hepatic enzymes; (b) hepatic histological characteristics; (c) hepatic antioxidant enzymes; and (d) several metabolic fluxes. The latter comprised gluconeogenesis, ureagenesis and oxygen consumption. Groups treated with saline or FM, 1.1 or 2.2 mg.kg<sup>-1</sup>, 2 h before or 2 h after LPS inoculation were evaluated. Liver damage in sepsis was indicated by histological changes and increased plasma levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Furthermore, the increased catalase and superoxide dismutase activities and the enhanced lipid peroxidation were indicative of oxidative stress. Pre-treatment of the animals with FM decreased these variables and increased the hepatic availability of reduced glutathione. Consistently, FM was found to have antioxidant activity by reductive DPP<sup>+</sup> radicals in vitro. Treatment of rats with FM before LPS inoculation normalized glucose production and partly restored ureagenesis. These results show that LPS induces oxidative stress and that it is able to affect liver metabolism. Furthermore, the antioxidant properties of FM could be co-responsible for restoring the liver functions by preserving the hepatocyte integrity.

Keywords: Endotoxemia, LPS, Flunixin Meglumin, Liver, Oxidative Stress.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Origens e progressão da sepse e sua interrelação com outras síndromes.....	15
FIGURA 2 - Formação de algumas espécies de radicais livres.....	20
FIGURA 3 - Esquematização do papel-chave do estresse oxidativo no processo inflamatório na sepse.....	21
FIGURA 4 - Representação esquemática da parede celular das bactérias gram-negativas, sendo representados lipídeo A, lipoproteína e O-antígeno.....	22
FIGURA 5 - Família de proteínas <i>Toll-like</i> , ligação do LPS no receptor e sinalização celular desencadeada.....	23
FIGURA 6 - Fórmula estrutural do flunixin meglumine.....	30

## ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1 - Effects of FM on the plasma levels of enzymes and urea after sepsis induction.....	44
FIGURE 2 - Histopathological changes induced by LPS in the liver tissue (12 h after injection) and the effects of FM.....	46
FIGURE 3 - Evaluation of the DPP+ reductive activity of FM in the range between 10 and 1000 µg/mL .....	48
FIGURE 4 - Effect of FM on liver SOD and CAT enzymatic activity, lipid peroxidation and GSH levels after sepsis.....	49
FIGURE 5 - Time-courses of hepatic glucose and urea productions and oxygen uptake: influence of LPS-induced sepsis and flunixin-meglumin (FM).....	52

## **LISTA DE TABELAS**

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

TABLE 1 - Histopathological changes caused by LPS and action of FM pre- and post-treatment at 12 h.....	47
TABLE 2 - Influence of the LPS and the flunixin meglumine (FM) on alanine metabolism.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$   
IL-2 - Interleucina 2  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-8 - Interleucina 8  
IL-10 – Interleucina 10  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E2  
TXA<sub>2</sub> – Tromboxano A2  
PAF – Fator de ativação plaquetária  
Th1 – *T helper 1*  
ATP – Adenosina trifosfato  
ERO – Espécies reativas de oxigênio  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio  
GSSG – Glutathiona Oxidada  
EROS – Espécies reativas de Oxigênio  
iNOS – Óxido nítrico sintase  
cPLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub>  
AA – Ácido araquidônico  
LPS - Lipopolissacarídeo  
CYP450 – Citocromo P450  
IL-1RA – Antagonista do receptor de Interleucina 1  
PEPK – Fosfoenol piruvato carboxiquinase  
AINES – Antiinflamatórios não esteroidais  
TXS - Tromboxanos  
PGF1- $\alpha$  - Prostaglandina F1- $\alpha$

## ARTIGO CIENTÍFICO

NSAIDs: Non-steroidal anti-inflammatory drugs  
FM: flunixin-meglumin  
ROS: reactive species of oxygen  
LPS: lipopolysaccharide  
TNF- $\alpha$ : tumoral necrosis factor alfa  
COX: cyclooxygenase  
SOD: superoxide dismutase  
CAT: catalase  
GSH: reduced glutathione  
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
1.1. Sepsis: breve histórico e epidemiologia.....	14
1.2. Características fisiopatológicas envolvidas na SIRS e na sepsis .....	16
1.3 Via oxidativa mitocondrial: fator regulatório da ativação de componentes inflamatórios .....	19
1.4. LPS e o processo inflamatório .....	22
1.5. Disfunções hepáticas na sepsis .....	26
1.6. Tratamentos disponíveis para a sepsis .....	28
1.7. Flunixin Meglumine (FM) .....	30
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos Específicos.....	33
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>34</b>
1. Introduction .....	37
2. Materials and Methods.....	39
2.1. Animals .....	39
2.2. Experimental design.....	39
2.3. Blood sample processing and assays .....	39
2.4. Tissue preparation for light microscopy.....	40
2.5. In vitro evaluation of the DPP+ reductive activity of FM .....	40
2.6. Determination of superoxide-dismutase and catalase activity.....	40
2.7. Lipid peroxidation .....	41
2.8. Reduced glutathione (GSH) levels .....	41
2.9. Liver perfusion.....	41
2.10. Statistical Analysis.....	42
3. Results.....	43
3.1. Effect of FM on plasma levels of enzymes and urea .....	43
3.2. Histological analyses.....	44
3.3. Evaluation of the DPP+ reductive activity of FM.....	47
3.4. Effects of FM on hepatic oxidative stress parameters .....	48
3.5. Effect of FM on hepatic gluconeogenesis and ureagenesis .....	50
4. Discussion .....	54

Acknowledgements.....	57
References .....	58
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS.....</b>	<b>62</b>

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Sepsis: breve histórico e epidemiologia

As doenças causadas por microorganismos são um problema antigo enfrentado pela humanidade. Na antiga Grécia usava-se o termo “*Pepse*” para designar o processo de fermentação do vinho ou digestão da comida que indicava vida e boa saúde, e o termo “*Sepse*” para descrever casos onde havia putrefação, sendo associado com doença e morte (MAJNO, 1991). Sepsis tornou-se então uma condição clínica resultante de infecção bacteriana e a septicemia a presença desses microorganismos na corrente sanguínea.

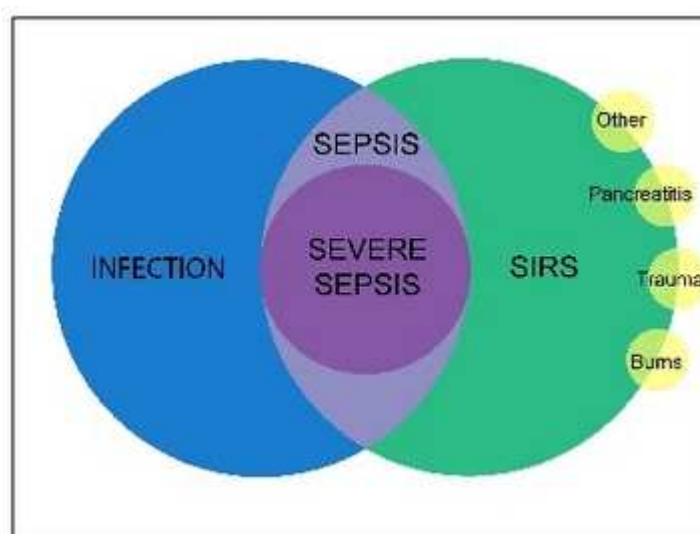
Referências sobre as manifestações clínicas da sepsis podem ser encontradas até mesmo em textos de Hipócrates (460 – 377 a.C.), que relatou um processo de “perigo, deterioração biológica fétida ou putrefação”. Em 1879-80, Louis Pasteur encontrou, pela primeira vez, bactérias no sangue de uma paciente que sobreviveu à sepsis, mas foi somente no século XVIII que o médico húngaro Ignaz Semmelweis relacionou medidas simples de higiene por parte dos médicos e estudantes, como lavar as mãos antes do contato com pacientes, com uma redução expressiva da mortalidade de mulheres no puerpério (DE COSTA, 2002). Nos dias atuais, Bone e colaboradores (1992) definiram sepsis como sendo uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ocorrer durante uma infecção (BONE *et al.*, 1992)

Aproximadamente um século após a observação feita por Pasteur é que finalmente se chegou a um consenso sobre a definição de sepsis. Esta relativa demora se deve principalmente à dificuldade de identificação desta síndrome por clínicos e pesquisadores, uma vez que os sinais e sintomas clínicos variam enormemente dependendo do estágio da síndrome em que o paciente se encontra (ANNANE, 2005).

Em 1992, a sepsis foi definida na Conferência de Consenso feito em Chicago pela *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine* como uma resposta inflamatória sistêmica à infecção, com possibilidade de evolução para quadros clínicos, cujos sintomas e sinais diferem enormemente à medida que a doença evolui (BONE *et al.*, 1992). Por definição, a sepsis pode ser manifestada pela presença de dois ou mais dos seguintes sintomas:

- a) alteração de temperatura, acima de 38°C ou abaixo de 36°C;
- b) aumento de frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto ou  $\text{paCO}_2$  menor que 32 mmHg;
- c) contagem de leucócitos no sangue acima de 12.000/ $\text{mm}^3$  ou menor que 4.000/ $\text{mm}^3$  (BONE *et al.*, 1992).

Nesta mesma ocasião foram estabelecidos critérios para a classificação de sepse e doenças similares, optou-se por enquadrá-las como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*). Como ilustrado na figura 1, há convergência de sinais e sintomas entre estas síndromes.



**Figura 1.** Origens e progressão da sepse e sua interrelação com outras síndromes.

(Fonte: <http://www.scribd.com/doc/6976100/MURILLO-ASSUNCAO-2008-Sepse-100-Anos-de-Historia-e-Para-Onde-Caminhamos>)

Além disso, ficou estabelecido também que o termo sepse deverá ser utilizado apenas nos casos onde a infecção é documentada, pois aproximadamente 70% dos pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) desenvolvem a SIRS, que pode ocorrer também em associações com eventos não infecciosos (além da infecção por bactérias, vírus e fungos), considerados como “estéreis”, tais como trauma, queimadura, choque hemorrágico e pancreatite aguda (BEISHUIZEN *et al.*, 1999). Esta medida foi necessária para adequação do tratamento à fase de evolução da síndrome em que o paciente se encontra e possibilidade de intervenção terapêutica adequada, uma vez que a incidência de sepse vem aumentando nos

últimos anos, sendo considerada a principal causa de morte em unidades de tratamento intensivo não-coronarianas. Anualmente, em todo o mundo, ocorrem cerca de 18 milhões de casos de sepse grave (SALES JUNIOR *et al*, 2006).

As mais freqüentes fontes de infecção que podem desencadear o desenvolvimento da sepse são de origem pulmonar, abdominal, urinária, cutânea e por catéteres vasculares. Os microorganismos causadores são na maioria bactérias, embora uma parcela dos casos seja originada por infecções virais ou fúngicas. O choque séptico é uma complicação em pelo menos 50-60% de bacteremias Gram-negativas e em 5-10% de bacteremias Gram-positivas ou infecções fúngicas. Acredita-se que o aumento na incidência da síndrome seja devido ao crescente número de pacientes imunodeprimidos, uso freqüente de procedimentos invasivos, freqüência no uso de antibióticos (geração de mais microorganismos resistentes), além do aumento da expectativa de vida, a qual aumenta o número de pacientes idosos (RANGEL-FRAUSTO, 2005).

Recentemente foi lançada a campanha mundial “*The Surviving Sepsis Campaign*” para unificação dos critérios de diagnóstico e de tratamento da síndrome séptica. Esta campanha está abrangendo vários profissionais da saúde, sociedades de medicina de terapia intensiva, organizações políticas e financiadoras, além de pacientes e de seus familiares. Dentre os vários objetivos, almejou-se diminuir em 25% a mortalidade associada à sepse até o ano de 2008 (LEVY *et al.*, 2003).

## **1.2. Características fisiopatológicas envolvidas na SIRS e na sepse**

Muitos mecanismos estão envolvidos na fisiopatologia da SIRS e da sepse, incluindo liberação de citocinas, ativação de neutrófilos, monócitos e células endoteliais, bem como ativação de reflexos neuroendócrinos e sistemas de cascatas de proteínas plasmáticas, como o sistema complemento e os sistemas de coagulação e o fibrinolítico. Há interações complementares e sinérgicas de diferentes componentes dessas cascatas, o que dificulta o tratamento dessa síndrome (LIU & MALIK, 2006).

A resposta sistêmica à infecção é mediada através de citocinas produzidas por macrófagos, que estimulam receptores específicos das células do sistema imunológico e de órgãos-alvo. A liberação de citocinas como interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é um evento deflagrado precocemente

neste processo (MEDZHITOV & JANEWAY, 1998, CAO *et al.*, 1997, MEDZHITOV & JANEWAY, 2000, SKIDMORE *et al.*, 1975, STRIETER *et al.*, 1993). Estas citocinas estimulam a liberação de outros mediadores da resposta inflamatória, como produtos derivados do ácido araquidônico (prostaglandina E<sub>2</sub> [PGE<sub>2</sub>] e conseqüentemente tromboxano A<sub>2</sub> [TXA<sub>2</sub>]), fator de ativação plaquetária (PAF), peptídeos vasoativos como bradicinina a angiotensina II e o peptídeo intestinal vasoativo, aminas como histamina e serotomina além de uma variedade de produtos derivados do complemento, assim como outras citocinas (VINCENT, 2000).

A literatura científica tem contradições quanto à sepse ser caracterizada por curto período da síndrome de resposta inflamatória sistêmica, seguido por um sustentado período de imunossupressão e anti-inflamação, chamado síndrome da resposta antiinflamatória compensatória (CARS). Alguns autores propõem que a SIRS prossegue pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e outras, sobreposta à CARS. A CARS é caracterizada por defeito na apresentação de antígeno, “paralisia” de macrófagos, anergia de células T, supressão de proliferação de células, diminuição da proliferação de células Th1 e aumento de apoptose das células B e T. Em alguns pacientes é difícil estabelecer o adequado equilíbrio deste processo, e neste estágio o controle é perdido, ocorrendo uma intensa reação inflamatória (PINSKY *et al.*, 1993, DEMBIC, 2000, BONE, 1991). Neste caso a sepse progride ao choque séptico, caracterizado pela queda drástica da pressão arterial, com conseqüente déficit da perfusão tecidual.

Com a queda da perfusão tecidual, diversos mecanismos neuro-humorais tentam manter o débito cardíaco e a pressão arterial. Estes incluem reflexos mediados por barorreceptores, liberação de catecolaminas, ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona, liberação de hormônio antidiurético e estimulação simpática generalizada (COTRAN *et al.*, 1996). A vasoconstrição pode ser intensificada pela subsequente liberação de mediadores humorais constritores, como TXA<sub>2</sub>, leucotrienos (LTs) e opióides endógenos (BOGOSSIAN, 1992). O efeito desencadeado é taquicardia e vasoconstrição periférica, como um mecanismo de conservação de líquidos pelos rins (COTRAN *et al.*, 1996). Dentre os mediadores envolvidos nesse processo hemodinâmico e cardiovascular, o TNF- $\alpha$  e seus efeitos sinérgicos com outros mediadores, são provavelmente os responsáveis pela depressão do miocárdio (COSTELLO *et al.*, 2003) e pela hipotensão, que resultam na disfunção de órgãos durante a evolução da sepse severa (RICE & BERNARD,

2005). Subseqüentemente, a vasoconstrição gerada compromete a microcirculação, levando os tecidos à hipóxia grave do tipo isquêmica. Como conseqüência há queda no pH celular, além da liberação de produtos da respiração anaeróbica e de mediadores humorais dilatadores (cininas, histamina, serotonina, proteases, etc). Esses mediadores neutralizam a resposta vasomotora constritiva, originando vasodilatação súbita periférica e dificultando o retorno venoso (BOGOSSIAN, 1992). A liberação de mediadores, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  (COSTELLO *et al.*, 2003), é tão intensa que é chamada por alguns autores de *cytokine storm* (MATSUDA & HATTORI, 2006). Para outros, o reconhecimento de que esses mediadores inflamatórios têm função-chave em enfermidades como SIRS e MODS (Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos) é uma das mais destacadas descobertas na medicina de emergência moderna (JOHNSON *et al.*, 2004), tamanha é a sua importância.

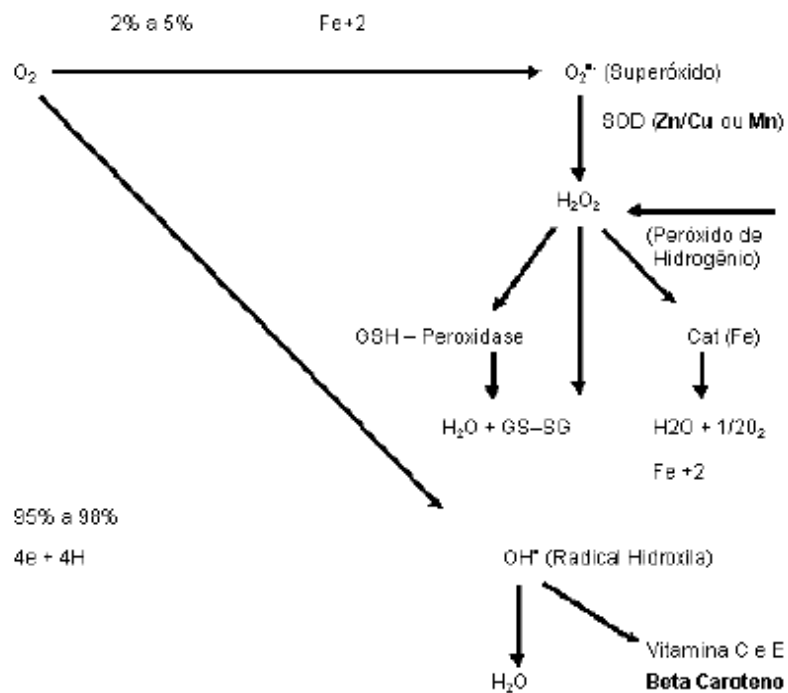
Um das conseqüências dessa resposta inflamatória exacerbada é a ativação dos sistemas de coagulação, levando à coagulação e acúmulo de fibrina, na chamada coagulação intravascular disseminada (CID). A CID causa oclusão trombótica de pequenos vasos, o que contribui para a MODS, além de induzir à coagulopatia por consumo de plaquetas e dificultar ainda mais a perfusão tecidual (HOPPER & BETEMAN, 2005). A partir do momento em que a célula começa a não receber seu suprimento normal de oxigênio, por estase microcirculatória ou por isquemia, surgem os problemas da hipóxia, como o acúmulo de lactato resultante do metabolismo anaeróbico, gerando acidose láctica e diminuição da maquinaria energética celular. Há diminuição da capacidade de funcionamento de mecanismos ATP-dependentes, como a bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase, originando alteração no potencial de membrana celular (SILVA *et al.*, 2003). O metabolismo celular inadequado, em decorrência de defeitos na produção energética mitocondrial, é uma das principais causas de disfunção orgânica em pacientes sépticos (HOTCHKISS & KARL, 1992). Na vigência do dano celular todas as estruturas nobres são atingidas, mas os principais problemas se situam na membrana celular lipoprotéica, nos lisossomos, ribossomos e nas mitocôndrias (BOGOSSIAN, 1992), organelas detentoras da maquinaria energética e metabólica celular.

### 1.3 Via oxidativa mitocondrial: fator regulatório da ativação de componentes inflamatórios

Os mecanismos envolvidos na sepse, no choque e na MODS são multifatoriais. Como supracitado, mecanismos moleculares relacionados à inflamação, hemodinâmica e danos celulares estão presentes na patogênese do choque endotóxico. O colapso funcional detectado em muitos órgãos na MODS pode ser resultado da apoptose mediada por citocinas (JOHNSON *et al.*, 2004). No entanto, dentre outros evidentes mecanismos participantes, inclui-se a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) em decorrência da isquemia (JOHNSON *et al.*, 2004; WALKER *et al.*, 2007) ou da atividade de neutrófilos, desencadeadores do dano tecidual (SAKAGUCHI & FURUSAWA, 2006).

Radicais livres são moléculas ou porções moleculares, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital exterior, um estado que aumenta consideravelmente sua reatividade (DE GROOT, 1994). As espécies reativas mais conhecidas de radicais livres de oxigênio incluem o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ) e o peroxinitrito (DE GROOT, 1994). O ânion superóxido é enzimaticamente reduzido a peróxido de hidrogênio na presença de superóxido dismutase (SOD), que o mantém assim em níveis controláveis. Todavia, em muitas doenças, a exemplo do choque endotóxico, há um desequilíbrio entre a concentração de ânion superóxido formado e a habilidade da SOD em removê-lo, caracterizando o estresse oxidativo (SALVEMINI & CUZZOCREA, 2002). A figura 2 ilustra a cascata de formação de ERO.

Das espécies reativas de oxigênio, o ânion superóxido tem sido descrito como coadjuvante na patogenia do choque endotóxico (SALVEMINI & CUZZOCREA, 2002), pois é um mediador pró-inflamatório, cujas propriedades incluem o recrutamento de neutrófilos ao local da inflamação, formação de fatores quimiotáticos (CUZZOCREA *et al.*, 2001), danos ao DNA e liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , via ativação do fator nuclear (NF)- $\kappa$ B (LIAO & LIBBY, 1999). Na endotoxemia ocorre também lipoperoxidação induzida por radicais livres em tecidos isquêmicos, propiciada pela coagulação intravascular disseminada (SAKAGUCHI & FURUSAWA, 2006)



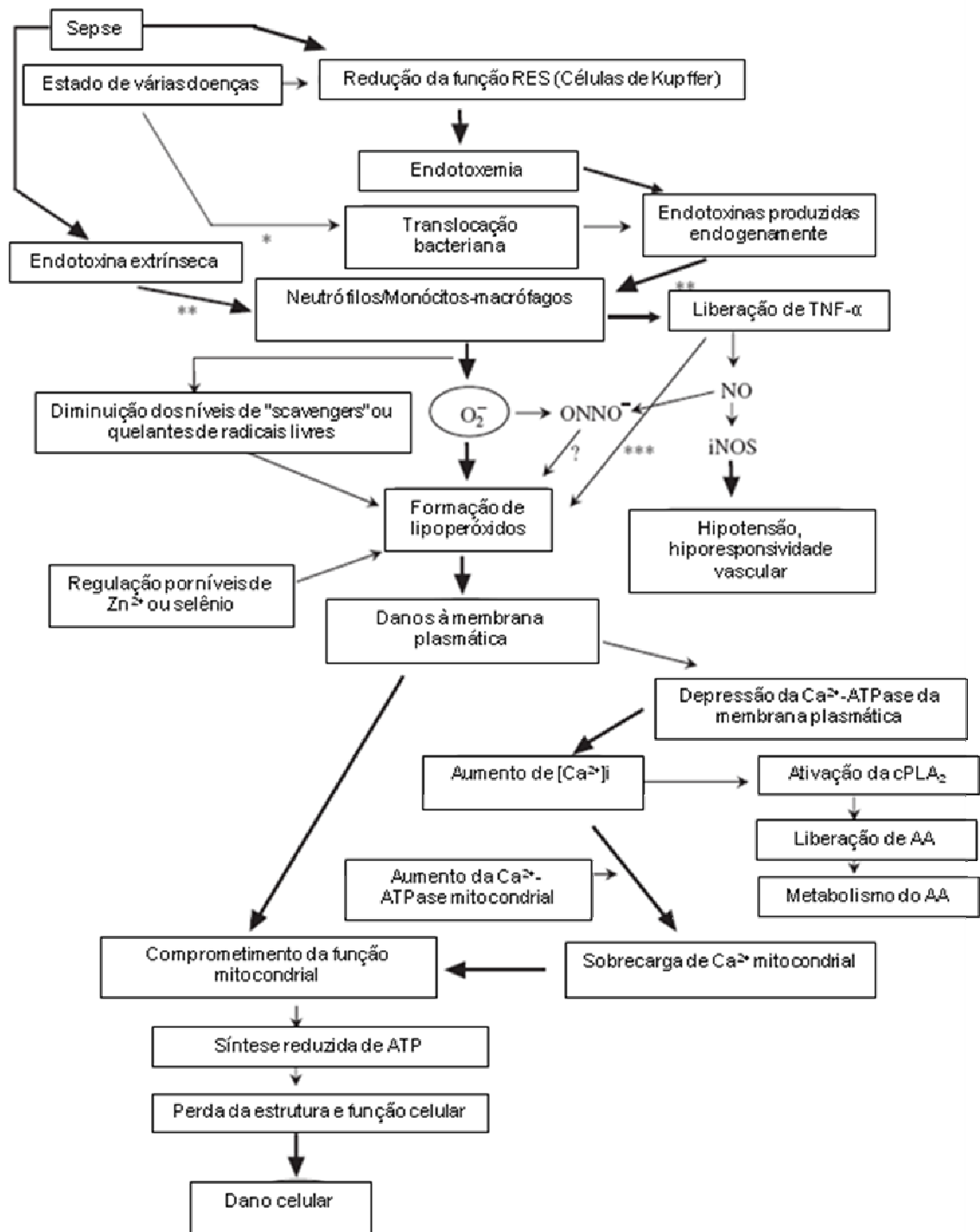
**Figura 1, Formação das EROS**  
 SOD – Superóxido dismutase, Cat – Catalase,  $O_2^{\bullet -}$  – Superóxido,  $O_2$  – Oxigênio, GSSH – Glutaciona Oxidada, GSH – Glutaciona Peroxidase,  $H_2O$  – Água,  $OH^{\bullet}$  – Radical Hidroxila, GSH – Glutaciona Reduzida,  $H_2O_2$  – Peróxido de Hidrogênio.

**Figura 2.** Formação de algumas espécies de radicais livres (Sies, 1991)

Adicionalmente, o  $TNF-\alpha$  *per se* é responsável pela produção excessiva de radicais livres na presença de endotoxemia (SAKAGUCHI & FURUSAWA, 2006), bem como é um dos fatores desencadeadores, junto com o LPS, da ativação do  $NF-\kappa B$ . Por mecanismos gênicos o grupo de proteínas transcricionais  $NF-\kappa B$ , induz à produção de vários outros componentes inflamatórios, como citocinas, NO, cicloxigenase e lipoxigenase (LIU & MALIK, 2006). Existe, portanto, uma correlação positiva entre sepse,  $TNF-\alpha$ , estresse oxidativo e  $NF-\kappa B$ , sendo este o alvo final dos indutores de choque séptico, de modo que sua inibição pode ser um sítio terapêutico interessante para controlar a SIRS associada à sepse. A figura 3 sumariza os efeitos celulares de ERO e moléculas inflamatórias na sepse.

O estresse oxidativo mitocondrial desencadeado pela ativação do  $NF-\kappa B$  (LIU & MALIK, 2006) induz à redução da produção de energia celular. Esta deterioração energética tem correlação com as alterações metabólicas descritas no choque séptico, envolvendo principalmente a função mitocondrial de hepatócitos. Esta

situação compromete ainda mais a maquinaria energética celular e o metabolismo, gerando um ciclo letal para as células.

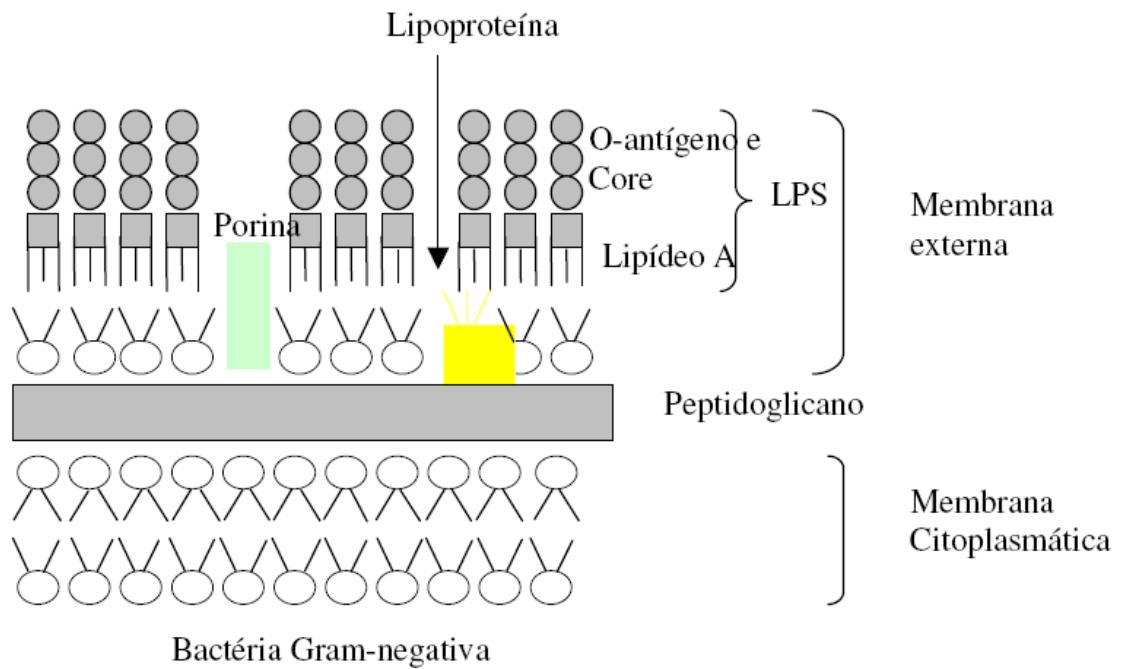


**Figura 3.** Esquematisação do papel-chave do estresse oxidativo no processo inflamatório na sepse (Adaptado de SAKAGUCHI & FURUSAWA, 2006).

#### 1.4. LPS e o processo inflamatório

A sepse e o choque séptico são principalmente provocados por endotoxinas de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, espécies de *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia* (COTRAN *et al.*, 1996), e, menos comumente, por exotoxinas de bactérias Gram-positivas, vírus e fungos (BOGOSSIAN, 1992). As endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) derivados da desintegração da membrana celular de bactérias Gram-negativas mortas (BOGOSSIAN, 1992). O LPS é a forma que melhor caracteriza a endotoxemia por Gram-negativos, porém outros componentes bacterianos, incluindo peptidoglicanas e ácido lipotécóico produzem síndromes clinicamente indistinguíveis da endotoxemia (MACKAY, 1987).

O LPS de várias famílias microbianas Gram-negativas é constituído do mesmo princípio arquitetônico (Figura 4): polissacarídeo ligado covalentemente com o lipídeo A (LA). A cadeia O é característica e única para cada sorotipo bacteriano, sendo um importante fator de virulência. O LA representa o princípio endotóxico do LPS, e quando bioativo forma micelas em meio aquoso, pela sua característica anfófila. Em condições fisiológicas de eletrólitos e pH, apresenta-se exclusivamente em estrutura cúbica ou hexagonal (RIETSCHEL *et al.*, 1996).

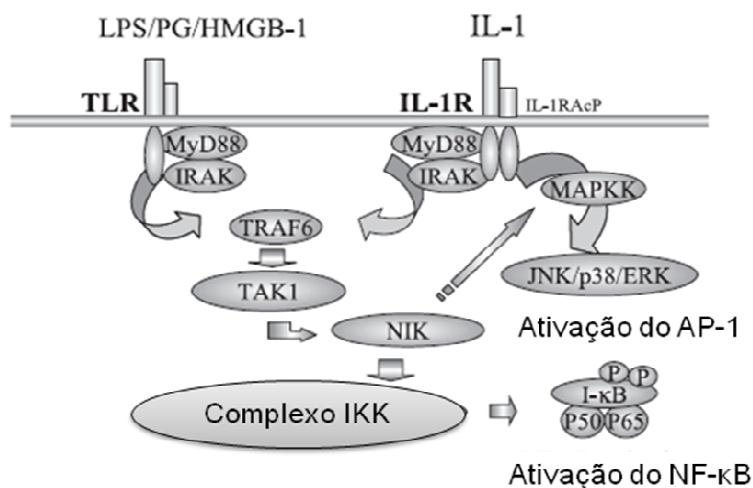


**Figura 4.** Representação esquemática da parede celular das bactérias Gram-negativas, sendo representados lipídeo A, lipoproteína e O-antígeno (SORIANO, 2006).

O LPS pode ser reconhecido pela resposta imunológica inata, que utiliza sistemas de reconhecimento primitivos e inespecíficos que permitem sua ligação a muitos produtos microbianos (KOURILSKY & TRUFFA-BACHI, 2001). Estas estruturas estão referidas como “padrões moleculares associados a patógeno” (PAMP) (p ex. LPS, peptidoglicano, ácidos lipoteicóicos, mananos, DNA das bactérias, RNA de dupla-fita e glucano) e os receptores do sistema da imunidade inata que estão envolvidos no reconhecimento do padrão (PRR). Estes receptores estão expressos em muitas células efetoras do sistema inato, tais como macrófagos, células dendríticas e células B – as células “profissionais” de apresentação de antígeno. Os LPS-PRRs reconhecem LPS de bactérias Gram-negativas e alertam o sistema imunológico sobre a presença das bactérias (DEMBIC, 2000).

O principal mecanismo pelo qual o LPS atua é através de um complexo com a proteína ligadora de LPS sinalizando através de receptores *Toll-like 4* (TLR-4), uma proteína transmembrana que é predominantemente ativada pelo LPS. A sinalização intracelular depende da ligação do domínio intracelular do TLR-4 ao IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*), um processo que é facilitado por proteínas adaptadoras, entre elas a MyD88 (*myeloid differentiation protein 88*).

Posteriormente, ocorre ativação do TRAF6 (*TNF-receptor activated factor-6*) que coordena a fosforilação do I $\kappa$ B, inibidor do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), por ativar o complexo IKK (I $\kappa$ B quinase) (COHEN, 2002, SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004) conforme mostrado na figura 5.



**Figura 5.** Família de proteínas *Toll-like*, ligação do LPS no receptor e sinalização celular desencadeada (Adaptado de SORIANO, 2006).

A fosforilação do I $\kappa$ B pelo IKK leva à sua degradação por proteassoma; o dímero NF- $\kappa$ B citosólico é então liberado e translocado para o núcleo da célula, onde inicia a transcrição de diversos genes cujos produtos são reguladores da resposta inflamatória (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004, COHEN, 2002). Além da fosforilação do I $\kappa$ B, o IKK também regula a transcrição por fosforilar diretamente proteínas do NF- $\kappa$ B (GHOSH & HAYDEN, 2008). À parte a estes mecanismos, as células também podem responder ao LPS através de receptores intracelulares denominados NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) (INOHARA *et al.*, 2001, Cohen, 2002), resultando na ativação de monócitos e macrófagos. Estas células ativadas liberam grande quantidade de citocinas, principalmente de TNF- $\alpha$  (SAKAGUCHI & FURUSAWA, 2006), que pode ser considerado o mediador principal que ativa o processo de sepse (HAVEMAN *et al.*, 1999; COSTELLO *et al.*, 2003). Em meados de 1970, descobriu-se o TNF como resultado de longas pesquisas sobre mecanismos que caracterizavam os efeitos autoimunes induzidos por endotoxinas (OLD, 1988, CARSWELL *et al.*, 1975). Entretanto, somente após a clonagem dos genes para o TNF em 1984-1985 (PENNICA *et al.*, 1984, WANG *et*

*al.*, 1985) é que as investigações sobre seus efeitos tornaram-se mais claras. O envolvimento do TNF como mediador do choque endotóxico foi descrito inicialmente por Beutler, (1990) e Tracey, (1992), os quais demonstraram que a imunização passiva contra o TNF protegia ratos dos efeitos letais das endotoxinas, como hipotensão ou taquicardia.

O LPS também pode se ligar a CD14 solúvel, e este complexo subsequente interage com receptores de células endoteliais (ULEVITCH & TOBIAS, 1995). Considerando que células endoteliais ativadas liberam mediadores inflamatórios, como IL-1 e IL-6, eicosanóides, espécies reativas de oxigênio (ERO), fator de ativação plaquetária (PAF) e óxido nítrico (NO), produtos da parede celular bacteriana interagem e ativam o sistema complemento e também a cascata de coagulação, danificando a superfície do endotélio. Durante a ativação do endotélio a expressão de moléculas de adesão é aumentada, e granulócitos polimorfonucleares se tornam ativados e se acoplam ao endotélio (HAVEMAN *et al.*, 1999). Os granulócitos ativados liberam ERO e proteases, com o intuito de inativar microorganismos. Porém, esses produtos podem também danificar as células endoteliais (WEISS, 1989, VICTOR *et al.*, 2004), fomentando os danos hemodinâmicos do choque.

Dada a existência de muitas variáveis para os estudos clínicos, modelos animais são considerados de suma importância para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sepse, e os experimentos em animais têm contribuído significativamente para a compreensão de muitos aspectos da sepse e do choque séptico, além de servirem como testes preliminares para novas terapias antes de tentativas clínicas (RITTIRSCH *et al.*, 2007).

Em função das alterações celulares e sistêmicas provocadas pelo LPS, injeções desta endotoxina ou de bactérias viáveis são modelos há muito utilizados devido à sua simplicidade e alta reprodutibilidade, mimetizando vários efeitos observados em pacientes sépticos (TITHERADGE, 1999). O LPS induz hipofagia, perda de peso e hipolocomoção, sintomas coletivamente relacionados à prostração (CONNOR *et al.*, 2002).

As endotoxinas, como o LPS, adicionalmente são um importante fator na relação entre toxemia e hepatotoxicidade, na qual há envolvimento das células de Kupfer, que são alvos comuns de agentes tóxicos (SAKAGUCHI & FURUSAWA, 2006).

Como o fígado é o principal órgão integrador do metabolismo, em condições patológicas como no choque endotóxico, a homeostasia é prontamente afetada.

### **1.5. Disfunções hepáticas na sepse**

A sepse geralmente pode progredir para falência de múltiplos órgãos e sistemas (BONE *et al.*, 1997). A SIRS evolui freqüentemente com disfunção de órgãos, e praticamente todos os pacientes em sepse apresentam disfunção de órgãos, ou em pelo menos um órgão, na evolução da doença. O fígado é o segundo órgão mais afetado na sepse, sendo os pulmões os primeiros. Sabe-se que as vias metabólicas na sepse são alteradas (BEAL & CERRA, 1994), pois estudos tem demonstrado que a injeção de LPS em animais leva à queda ou aumento de produção de metabólitos, dependendo do caso e via envolvida (PASTOR & SUTER, 1999).

Assim como outras disfunções orgânicas desencadeadas pelo processo séptico, a disfunção hepática pode ser secundária à interferência direta sobre o funcionamento celular ou hipoperfusão tecidual. Em paralelo, a disfunção hepática e a conseqüente queda na depuração de várias substâncias podem acentuar a resposta inflamatória ao retardar a depuração de endotoxina e/ou de citocinas. Uma característica importante da disfunção hepática é sua contribuição à hiperlactatemia, que na sepse é multifatorial. Os principais fatores que contribuem para a hiperlactatemia são queda acentuada da perfusão tecidual, inibição da piruvato desidrogenase e diminuição da depuração do lactato pelas células hepáticas. Embora a disfunção hepática isoladamente não seja responsável pela hiperlactatemia na sepse, pode contribuir para sua manutenção ou pelo atraso de sua normalização (PASTOR & SUTER, 1999).

Vary & Kimball, (1992), verificaram durante a sepse experimental por LPS que concentrações plasmáticas de proteínas hepáticas como proteína C reativa, anti-tripsina e fibrinogênio estavam aumentadas. Essas proteínas são de fase aguda e modulam funções imunológicas, reparam a lesão tecidual e possuem um efeito protetor sobre a lesão induzida pelo LPS e pelo TNF- $\alpha$ . O aumento no transporte de aminoácidos nos hepatócitos é necessário para sustentar a síntese dessas proteínas. Em constraste, concentrações de albumina e transferrina foram diminuídas pelo LPS (OHTAKE & CLEMENS, 1991). A produção hepática de uréia

foi aumentada pelo aumento do consumo de aminoácidos depois do catabolismo de proteínas dos tecidos periféricos (OHTAKE & CLEMENS, 1991).

Numerosas alterações no metabolismo da glicose são descritas. A glicogenólise inicialmente estimulada pelo aumento da disponibilidade de aminoácidos e de lactato é também reduzida pela atividade de enzimas limitantes da via, como a fosfoenolpiruvato quinase (PEPK), que tem sua atividade reduzida pelo LPS. Em ratos com peritonite a atividade da fosfofrutoquinase foi estimulada devido à rápida acumulação de frutose 2,6 bifosfato, que é o mais potente regulador da gliconeogênese. Assim as hexoses são preferencialmente canalizadas para a via da glicólise ao invés da gliconeogênese (HILL & MCCALLUM, 1991). Conseqüentemente, como a glicose está limitada, a hipoglicemia severa pode ocorrer. A disponibilidade de glicose também pode modificar a resposta inflamatória do fígado, porque nas células de Kupfer, a liberação de IL-1 é baixa quando as células são incubadas em meio deficiente de glicose (ORLINSKA & NEWTON, 1993).

A redução da biotransformação é outra alteração hepática durante a sepse. Citocinas e o NO tem sido demonstrados como redutores da atividade de muitas enzimas do CYP450. Ainda, diminuição do fluxo da bile e diminuição da excreção da bile prejudicam a eliminação de vários compostos químicos e metabólicos (MOSELEY, 1997).

O fígado é um potente *scavenger* de LPS, bactérias e citocinas. Depois de injeção de uma alta dose da toxina em modelos murinos, muitas das endotoxinas são fagocitadas por células de Kupfer. Hepatócitos podem “limpar” e diretamente eliminar a endotoxina na bile. O fígado também remove bactérias do sangue, mas o *clearance* de bactérias é modificado pelo local de injeção e por doenças pré-existentes no fígado (DeCAMP *et al.*, 1992).

Em cães conscientes injetados com LPS, a produção de TNF- $\alpha$  foi verificada aumentada no fígado. Além de TNF- $\alpha$ , a injeção de LPS aumenta a produção de IL-1 em células de Kupfer (McGUINNESS *et al.*, 1996). Em fígados intactos, o RNAm de IL-1 $\alpha/\beta$  aumentou significativamente 1-2 h depois da injeção de LPS, enquanto o RNAm do antagonista do receptor IL-1 (IL-1ra) teve pico em 2-4 h depois. Deste modo, células de Kupfer produzem citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias. O fígado também participa do *clearance* de citocinas. Deste modo, este órgão tem

papel-chave na resposta inflamatória durante a sepse pela produção e *clearance* dessas citocinas (ANDUS *et al.*, 1991).

Como supracitado, numerosas funções hepáticas são modificadas na sepse experimental, essas modificações podem ser benéficas ou malélicas. Por um lado, durante a fase aguda há *scavenging* de bactérias e LPS e *clearance* de citocinas, que podem ser benéficos diminuindo o processo inflamatório. Por outro lado, a diminuição na biotransformação e a hipoglicemia podem ter conseqüências desastrosas.

### **1.6. Tratamentos disponíveis para a sepse**

Apesar da grande quantidade de investigações e de relatos sobre SIRS, sepse e síndromes correlatas nos últimos anos, e do indiscutível melhor entendimento sobre as suas respectivas patogêneses, a abordagem inicial da sepse continua sendo predominantemente de suporte. Na suspeita de SIRS, se nenhum outro importante evento não infeccioso é detectado, a conduta tomada é orientada para a sepse. Ou seja, além das medidas de suporte de vida, quando indicadas, outras medidas são tomadas de acordo com a gravidade de apresentação da respectiva síndrome (CARVALHO & TROTTA, 2003).

Os limites que separam a sepse da sepse grave, e esta do choque séptico ou da disfunção de múltiplos órgãos não são claramente detectados na prática clínica (BONE, 1996, PROULX *et al.*, 1996). No processo de evolução da resposta inflamatória da sepse ocorrem fenômenos cardiovasculares, como hipovolemia, vasodilatação periférica, depressão miocárdica, aumento da permeabilidade endotelial e hipermetabolismo. A terapia proposta ao séptico inclui ressuscitação volumétrica vigorosa. Também, o uso da dopamina é indicado como primeira escolha de terapia inotrópica, no lugar da dobutamina (CARCILLO & FIELDS, 2002).

Os antimicrobianos (AMs) são os agentes mais específicos e acessíveis para o tratamento do paciente com infecção, embora representem uma abordagem somente parcial do problema (BOCHUD *et al.*, 2001). Podem ser mais úteis no tratamento de estágios clínicos precoces da sepse, antes que a produção seqüencial dos mediadores do hospedeiro determine estágios mais adiantados na cascata inflamatória, com eventuais danos teciduais graves (BOCHUD *et al.*, 2001). Terapias empíricas com AMs têm sido recomendadas, especialmente em pacientes com

sepsis grave e choque séptico. Uma das tentativas de melhora da eficiência antibiótica é o aumento da imunidade inata, pelo aumento do número de leucócitos. No estudo de Root e colaboradores, o uso precoce de filgrastima em pacientes adultos, apesar de ter obtido o efeito esperado da droga (aumento de leucócitos até 75.-109 cel/L), não modificou a mortalidade dos pacientes em 28 dias (ROOT *et al.*, 2003). A maioria dos pesquisadores concorda que melhores taxas de sobrevivência em pacientes com sepsis grave só poderão ser atingidas com terapias adicionais às terapias antimicrobianas convencionais. Quanto mais se conhece a complexidade e a interdependência dos mecanismos fisiopatológicos da sepsis, mais se buscam estratégias terapêuticas com base em substâncias que modulem ou interrompam os efeitos dos mediadores endógenos e exógenos da sepsis (CARVALHO & TROTTA, 2003).

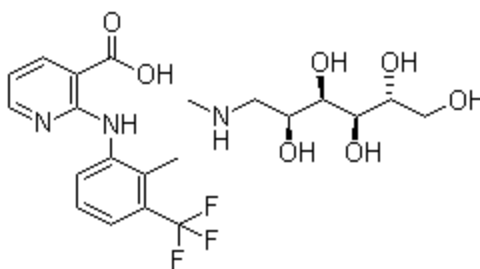
Os agentes que se ligam ou que neutralizam os componentes da parede celular bacteriana (anticorpos antiendotoxina, antiproteína de ligação de lipopolissacarídeos, antireceptores CD14, antiproteína de aumento de permeabilidade) ou aqueles que modulam a resposta imediata do hospedeiro a esses produtos tóxicos (pentoxifilina, aminononano) não se mostraram muito válidos para o tratamento da sepsis (CARVALHO & TROTTA, 2003). Sabe-se hoje que a produção de óxido nítrico (NO, vasodilatador endógeno), é responsável por alguns dos efeitos nocivos da resposta inflamatória sobre os órgãos-alvo (vasodilatação e hipotensão, e depressão miocárdica no choque séptico). Ele é produzido a partir da L-arginina, com o auxílio da NO sintase (NOs), sendo que a sua inibição ou bloqueio é uma das estratégias terapêuticas para minimizar esses efeitos. Embora a inibição da iNOS em animais com sepsis possa levar à normalização da pressão arterial, pode determinar também outros efeitos indesejáveis, tais como a redução do índice cardíaco e aumento de pressão pulmonar. Imagina-se que o inibidor da NOs - L-NAME (Nitro-L-arginina metil-éster) deva também inibir os efeitos benéficos do NO, e que apenas em situações de superprodução de NO poderia haver um real benefício desse agente. (CARVALHO & TROTTA, 2003). A estratégia terapêutica de utilização de inibidores da NOs não está suficientemente testada em humanos, e nenhuma correlação entre seus efeitos hemodinâmicos e a taxa de sobrevivência na sepsis foi estabelecida (CARVALHO & TROTTA, 2003).

O processo de ativação e degranulação de polimorfonucleares causado pelos mediadores inflamatórios determina uma grande produção de radicais livres.

Acredita-se que os antioxidantes endógenos (vitaminas C e E,  $\beta$ -caroteno, catalase e superóxido-dismutase) seriam insuficientes para neutralizar essa explosão de radicais livres e evitar o dano celular na SIRS. Estudos de sepse em modelos animais já mostraram efeitos benéficos de tratamento com enzimas antioxidantes sobre espécies reativas de oxigênio (superóxido-dismutase e catalase) (SAEZ-LLORENS & McCracken, 1993, RIVERS *et al.*, 2001). Outras terapias com agentes antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol, dimetilsulfóxido, coenzima Q10, N-acetilcisteína, glutatona, alopurinol, entre outras) estão em avaliação através de estudos em animais, com resultados ainda inconclusivos (RIVERS *et al.*, 2001). Considera-se que os produtos resultantes do metabolismo do ácido araquidônico pelas vias da cicloxigenase e da lipoxigenase, tais como prostaglandinas e tromboxanas, parecem desempenhar papel considerável nos órgãos-alvo quando da evolução da resposta inflamatória e da disfunção de órgãos (BERNARD *et al.*, 1997). Vários inibidores da cicloxigenase, conhecidos como antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), parecem ter efeito benéfico em pontos específicos da cascata inflamatória e na sobrevivência de animais, pois a intervenção em qualquer passo da seqüência dos eventos fisiopatológicos que caracterizam a resposta inflamatória sistêmica da sepse, no sentido de modular essa reação do hospedeiro, parece ser a estratégia terapêutica com maiores perspectivas de mudar os resultados desalentadores da progressão da sepse. (CARVALHO & TROTTA, 2003)

### **1.7. Flunixin Meglumine (FM)**

O flunixin meglumine (Figura 6), um ácido aminonicotínico, é um antiinflamatório não esteroidal (AINE) usado somente em Medicina Veterinária. Seu uso foi aprovado pelo *Food and Drug Administration (FDA)* para algumas espécies, como eqüinos e bovinos. A indicação primária consiste no tratamento de enfermidades músculo-esqueléticas e cólicas, em função de seu efeito antiinflamatório, propiciado pela inibição da enzima cicloxigenase (COX) e conseqüente inibição da formação de mediadores inflamatórios (TASAKA, 2006).



**Figura 6.** Fórmula estrutural do flunixin meglumine.

(Fonte: <http://www.chemblink.com/structures>)

Outras aplicações também lhe são atribuídas, como nos casos de choque endotóxico em eqüinos e bovinos, pelos efeitos antiinflamatórios e pela analgesia visceral que produz. O FM vem sendo utilizado em choque séptico também em pequenos animais, especialmente em cães, e em algumas espécies selvagens, como aves. O fundamento do uso deste AINE em endotoxemia consiste em seu efeito inibitório sobre TXs e prostaciclina, que são responsáveis por algumas das alterações cardiovasculares e metabólicas presentes nesta enfermidade (TASAKA, 2006). A aplicação de flunixin meglumine no tratamento do choque endotóxico em eqüinos causa significativa supressão na geração plasmática de tromboxano e prostaglandina F1- $\alpha$  (PGF1- $\alpha$ ). Na dose de 0,25 mg/kg provocou, em cavalos pré-medicados, significativa supressão nos índices de lactato sangüíneo (EMMA & NATHANIEL, 2002), que é um bom parâmetro indicador da gravidade da toxemia (CICARELLI *et al.*, 2006). Alguns trabalhos sugerem que os mecanismos anti-toxêmicos do flunixin são independentes da COX (LITTLE *et al.*, 2007a). Estes mecanismos não estão, no entanto, bem estabelecidos e há indicativos de efeitos reguladores do estresse oxidativo celular, da fosfatidil-inositol-3'-quinase, do desacoplamento da fosforilação oxidativa e do NF- $\kappa$ B (LITTLE *et al.*, 2007b). Embora as vias metabólicas hepáticas sejam alteradas em sepse e choque (HARDIE *et al.*, 1983), não há também descrição das interferências do FM sobre as mesmas.

Considerando a gravidade da condição clínica de pacientes acometidos por choque endotóxico, outras terapias têm sido testadas. A exemplo destas, inibidores da NOs e antiinflamatórios esteroidais, como a metilprednisolona. Há controvérsias quanto à redução da mortalidade também com relação ao uso deste último fármaco (WANG *et al.*, 2004; CICARELLI *et al.*, 2006;). Terapia com drogas anti-trombóticas em modelos animais de sepse a princípio mostrou-se benéfica, embora a extensão dos benefícios nas diferentes espécies e humanos não esteja estabelecida

(HOOPER & BATEMAN, 2005). Há controvérsias, portanto, quanto à terapia em endotoxemias, inclusive das drogas antiinflamatórias flunixin meglumine e metilprednisolona com relação à dose adequada, em que fase iniciar o tratamento, qual é a duração necessária do tratamento e sua eficácia em reduzir a mortalidade.

As informações anteriores mostram que há indicação para o uso do FM em outras situações clínico-veterinárias além do choque ou sepse. No entanto, alguns profissionais são resistentes ao seu uso em função dos efeitos colaterais. Via de regra, o FM não deve ser administrado por mais de 3 dias em cães ou 5 dias em eqüinos. Como os demais AINES, produz efeitos colaterais gastrintestinais quando utilizado por vários dias, inclusive com formação de úlceras de cólon ou estômago (FORNEY, 2007, LUNA *et al.*, 2007). Por esta razão, é usado em combinação com omeprazol, sucrato e cimetidina, e a combinação com outros AINES ou corticóides deve ser evitada (FORNEY, 2007). Outros efeitos colaterais podem incluir lesões hepáticas e alterações na coagulação (FORNEY, 2007, LUNA *et al.*, 2007). Adicionalmente, sua administração em cavalos com endotoxemia provocou alterações tardias (24 – 72 h) na concentração de testosterona sérica (DANEK, 2006).

Finalmente, ao considerarmos: 1) que a resposta orgânica à presença de endotoxinas envolve inflamação, estresse oxidativo, alterações celulares e metabólicas de modo cíclico e progressivo; 2) que a ausência de tratamento efetivo é um importante fator que contribui para a alta mortalidade no choque séptico (RIEDERMANN *et al.*, 2003); 3) que o flunixin meglumine apresenta potencial terapêutico nesses casos; e visando preencher as lacunas acerca de seus efeitos no metabolismo hepático, estresse oxidativo e inflamação durante endotoxemias, é que o presente trabalho foi delineado.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Verificar a ação anti-endotóxica do flunixin meglumine (FM) em modelo de toxemia induzida por LPS em ratos e a possível atuação da droga nas vias metabólicas hepáticas e no estresse oxidativo

### **2.2. Objetivos Específicos**

Investigar a natureza do estresse oxidativo e suas implicações no desenvolvimento da sepse e a ação do tratamento com FM através da mensuração da:

- a) Capacidade redutora do radical DPP+ pelo FM;
- b) Níveis de peroxidação lipídica e de glutatona (GSH);
- c) Atividade das enzimas superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT).

Verificar a função hepática durante a sepse e a ação do tratamento com FM através de experimentos de análises bioquímicas séricas (ALT, AST e uréia) e de perfusão hepática, verificando:

- a) Glicólise: pela produção de lactato e piruvato;
- b) Neoglicogênese: pela produção de glicose;
- c) Ureagênese: pela produção de amônia e uréia;
- d) Consumo de oxigênio.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

Fundamental & Clinical Pharmacology - Manuscript Proof



#### Hepatic effects of flunixin-meglumin in LPS-induced sepsis

Journal:	<i>Fundamental &amp; Clinical Pharmacology</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Ávila, Thiago; UFPR, Pharmacology Bastos-Pereira, Amanda; UFPR, Pharmacology Oliveira-Christoff, Adriana; UFPR, Pharmacology Soley, Bruna; UFPR, Pharmacology Queiroz-Telles, José; UFPR, Medical Pathology Eler, Gabrielle; UEM, Biochemistry Bracht, Adelar; UEM, Biochemistry Zampronio, Aleksander; UFPR, Pharmacology Acco, Alexandra; UFPR, Pharmacology Department
Keywords:	Sepsis, LPS, Liver, Oxidative-stress, Flunixin-meglumin
<b>Areas of Speciality</b>:	Liver And G-I Tract Pharmacology



Fundamental & Clinical Pharmacology - Manuscript Proof

# **Hepatic effects of flunixin-meglumin in LPS- induced sepsis**

Thiago Vinicius Ávila<sup>1</sup>, Amanda Leite Bastos Pereira<sup>1</sup>, Adriana de Oliveira Christoff<sup>1</sup>, Bruna da Silva Soley<sup>1</sup>, José Ederaldo Queiroz Telles<sup>2</sup>, Gabrielle Jacklin Eler<sup>3</sup>, Adelar Bracht<sup>3</sup>, Aleksander Roberto Zampronio<sup>1</sup>, Alexandra Acco<sup>1\*</sup>

1- Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Biological Science Building, 81530-990, Curitiba, Paraná, Brazil.

2- Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil;

3- Department of Biochemistry, State University of Maringá, Paraná, Brazil.

\*Corresponding author: +55 (41) 3361-1741

Email: aleacco@ufpr.br

Short Title: Flunixin-meglumin in LPS-induced sepsis

## Abstract

Sepsis leads to death of hepatocytes and impairment of liver function. Oxidative stress was identified as an important factor on its development. Although NSAIDs are not the indicated drugs for sepsis treatment, some of them have shown antioxidant capacity. The aim of the present study was to evaluate the actions of the NSAID flunixin-meglumin (FM) on the changes caused by LPS-induced sepsis in several variables. Flunixin-meglumine (FM) has been widely used in the veterinary clinics during sepsis treatment. The variables to be measured include plasma levels of hepatic enzymes, hepatic histological characteristics, hepatic antioxidant enzymes and several metabolic fluxes. The latter comprised gluconeogenesis, ureagenesis and oxygen consumption. Groups treated with saline or FM, 1.1 or 2.2 mg kg<sup>-1</sup>, 2 h before or 2 h after LPS inoculation were evaluated. Liver damage in sepsis was indicated by histological changes and increased plasma levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. Furthermore, the increased catalase and superoxide dismutase activities and the enhanced lipid peroxidation were indicative of oxidative stress. Pre-treatment of the animals with FM decreased these variables and increased the hepatic availability of reduced glutathione. Consistently, FM was found to have antioxidant activity by reductive DPP+ radicals *in vitro*. Treatment of rats with FM before LPS inoculation normalized glucose production and partly restored ureagenesis. These results show that LPS induces oxidative stress and that it is able to affect liver metabolism. Furthermore, the antioxidant properties of FM could be co-responsible for restoring the liver functions by preserving the hepatocyte integrity.

Keywords: sepsis, LPS, liver, oxidative-stress, flunixin meglumin

# 1. Introduction

Sepsis is considered a systemic inflammatory disorder which includes pathological changes such as endothelial damage, increased microvascular permeability, platelet aggregation, local blood flow reduction and ischemia-reperfusion injury [1]. Excessive inflammatory response may result in tissue injury which may lead to multiple organ injury and/or failure [1-4].

Multiple organ failure derived from sepsis is associated with an even higher mortality that increases substantially with the number of organs involved [5]. The liver is the second most commonly affected organ in sepsis/multiple organ failure and the development of this hepatic dysfunction is usually fatal [6]. Changes in liver functions such as gluconeogenesis and ureagenesis have been described [7-9]. Disturbances in these pathways may worsen the clinical condition of sepsis [9].

Microcirculatory failure resulting from the recruitment and activation of neutrophils is considered to be a critical event in the development of liver injury during sepsis [10]. Although neutrophils make an important contribution to the elimination of invading microorganisms, these phagocytic cells can also cause tissue damage that results from the overproduction of reactive oxygen species (ROS) and inflammatory mediators [11].

Regarding ROS, lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria (LPS) can activate macrophages and Kupffer cells, causing the generation of free radicals, including the superoxide anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and the hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), leading to oxidative damage in many tissues, including the liver [12]. NO can react with  $\cdot\text{O}_2^-$  to form the peroxynitrite anion ( $\text{ONOO}^-$ ), which oxidizes sulfhydryl groups and generates  $\cdot\text{OH}$  [13]. This may also precipitate circulatory failure, which is associated with a substantial increase in mortality [14]. Therefore, ROS, and particularly the superoxide anion, have been described as holding an important role in the pathogenesis of sepsis [15].

Besides the generation of ROS, LPS also induces the production of a variety of inflammatory mediators including cytokines such as interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor. The levels of TNF- $\alpha$  are particularly high during the first hours of sepsis [16-18]. These mediators amplify the inflammatory response inducing the expression of molecules such as nitric oxide synthase (which generates even

more NO) and cyclooxygenase (COX-2, which generates vasodilatory prostaglandins) [19-22].

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), which inhibit COX-2 and therefore prostaglandin synthesis, do not seem a useful therapeutic approach during sepsis [23] due to the variety of inflammatory mediators produced in this condition. However, flunixin-meglumine (FM), a well known NSAID, has been successfully used in the veterinary clinic to treat endotoxemia [24-26]. There is evidence that anti-toxemia mechanisms of some anti-inflammatory drugs, such as FM, are independent of COX inhibition [27]. Besides this, little mechanistic information is available, but a recent work suggests that NSAIDS have the capacity of scavenging free radicals and act as powerful antioxidants in the body [28].

In this study we have analysed the effect of pre- and post-treatment of animals with FM in sepsis induced by the intraperitoneal injection of LPS, with particular focus on the liver functions. We have investigated if FM treatment can reduce hepatocyte damage and if this reduction involves an antioxidant mechanism. Also, we evaluated the effectiveness of the FM in restoring gluconeogenesis and ureagenesis, essential pathways in the metabolic homeostasis.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Adult male Wistar rats weighing 180-220 g were used in all experiments. Animals were housed at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  under a 12 hour light-dark cycle, and had free access to standard laboratory food (Purina®) and tap water. The experiments were conducted following the recommendation of the Brazilian Law 6638, for the scientific management of animals and the procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (CEEA, certificate 279).

### 2.2. Experimental design

FM (Banamine® - Schering-Plough Laboratory) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 and administered intraperitoneally (i.p.) at doses of 1.1 or 2.2 mg kg<sup>-1</sup> (ANADA 200-308, FDA), 2 h before (pre-treatment) or 2 h after receiving i.p. 10 mg kg<sup>-1</sup> LPS (*E. coli*, 0111:B4, Sigma, USA). Control groups received only LPS, only FM at the same doses described before or PBS. Six and twelve hours after LPS injection (considered as time 0) animals were deeply anesthetized with i.p. injection of sodium thiopental (50 mg kg<sup>-1</sup>) and blood samples were collected from the cava vein using heparinized syringes to evaluate plasmatic urea and the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). At 12 h time point, the liver was also removed for the histological analyses and to evaluate the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, lipid peroxidation and reduced glutathione (GSH) levels.

### 2.3. Blood sample processing and assays

Plasma samples were prepared by centrifugation at 3000 g for 10 min and stored at  $-70^\circ\text{C}$ . Measurement of the plasma urea concentration and the activities ALT and AST were performed using commercial kits from Labtest Diagnostica (Lagoa Santa, Brazil).

## **2.4. Tissue preparation for light microscopy**

Samples of liver tissue were prepared as described before [29]. Briefly, samples were fixed in metacan solution (methanol 60%, chloroform 30% and acetic acid 10%) for 3 h at room temperature and then dehydrated in a graded series of ethanol before paraffin embedding (for 2 h at 58°C). Thin sections (4  $\mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin and eosin [30, 31] and analyzed under light microscopy.

## **2.5. In vitro evaluation of the DPP+ reductive activity of FM**

The reactivity of FM with the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil (DPPH) was measured according to the method described by Cheng [32], with few modifications. The system consisted of 750  $\mu\text{L}$  of test solution (FM 10-1000  $\text{mg mL}^{-1}$ ) and 250  $\mu\text{L}$  of methanol solution of DPPH (40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). After 5 min, the decrease in absorbance was measured at 517 nm. A solution with the reducing agent ascorbic acid (AA, 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) was used as positive control and distilled water as negative control.

## **2.6. Determination of superoxide-dismutase and catalase activity**

For the determination of the SOD and CAT activities, liver samples were homogenized in phosphate buffered solution (0.1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pH 6.5 at a ratio of 1:10 (200 milligrams of tissue to 1.8 mL of phosphate buffer) in a Politron homogenizer at 25000 rpm and centrifuged at 9700g for 20 min at 4°C. The SOD activity was measured by the ability of this enzyme to inhibit pirogallol self-oxidation [33]. The reaction was monitored in a microplate reader Sunrise Remote model (Tecan Deutschland GMBH, Germany) at 440 nm. The concentration of enzyme that inhibited the reaction by 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) was defined as one unit of SOD, and expressed as units of SOD per mg total protein (U SOD per  $\text{mg protein}^{-1}$ ).

The CAT activity was measured according to Aebi [34]. The reaction was monitored for 60 seconds at 240 nm in a spectrophotometer Model Ultrospec 4300 pro (Amersham Biosciences).

## **2.7. Lipid peroxidation**

The lipid peroxidation rate was measured by the FOX-2 method [35] which quantifies the formation of lipid hydroperoxides during peroxidation. Briefly, liver samples were homogenized in methanol (200 milligrams tissue in 1.8 mL methanol) in a Politron homogenizer at 25000 rpm and centrifuged at 5000g for 5 min at 4°C. The absorbance of the supernatant was measured at 560 nm in a spectrophotometer model Ultrospec 4300 pro.

## **2.8. Reduced glutathione (GSH) levels**

GSH levels were measured using the method described by Sedlak [36] which quantifies the formation of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)-sulfidryl groups by a colorimetric assay. A sample of tissue (100 mg) was homogenized in 900 µl of 0.1 M phosphate buffer pH 6.5 and the supernatant was incorporated with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) as reaction mixture. Absorbance was measured at 412 nm in a microplate reader using reduced glutathione as an external standard.

## **2.9. Liver perfusion**

The perfusion technique previously described by Scholz [37] was used. The perfusion fluid was Krebs–Henseleit-bicarbonate buffer, pH 7.4, containing 0.025% bovine serum albumin and saturated with an oxygen-carbon dioxide mixture (95:5%). The fluid was pumped through a temperature-regulated (37°C) membrane oxygenator prior to entering the liver via a cannula inserted in the portal vein. The perfusion flow was constant in each individual experiment and adjusted between 29 and 30 ml/min. Eighteen-hour fasted rats were submitted to the same protocol described earlier, with LPS injected at 9 h p.m. The perfusion experiments were done 12 h later, i.e., at 9 h a.m. The experimental protocol is illustrated by Figure 6. After a short pre-perfusion period, 2.5 mM alanine was infused as a gluconeogenic, ammoniagenic and ureogenic substrate. For the analytical procedures, samples of the effluent perfusion fluid were collected at 2-min intervals during the whole perfusion time and analyzed for

glucose, lactate, pyruvate, urea and ammonia. All these metabolites were assayed employing standard enzymatic procedures [38]. The oxygen concentration in the outflowing perfusate was monitored continuously employing a teflon-shielded platinum electrode adequately positioned in a plexiglass chamber at the exit of the perfusate [39]. Metabolic rates were calculated from input-output differences and the total flow rates and referred to the wet weight of the liver.

## **2.10. Statistical Analysis**

Statistical analyses consisted in one way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. The data of the liver perfusion experiments were analyzed by two way ANOVA with post-hoc Bonferroni multiple range testing and Newman Keuls test for multiple comparisons using the Graph Pad Prism 5.0 program. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effect of FM on plasma levels of enzymes and urea

Plasma levels of AST and ALT at 0, 6 and 12 h after LPS injection were measured in order to determine at which time the hepatic changes were more prominent. The results are shown in Figure 1A. Both the levels of AST and ALT were significantly increased 12 h after LPS injection while no difference was observed at 6 h. For this reason, all subsequent parameters were analyzed at 12 h after LPS injection.

The administration of FM alone (1.1 or 2.2 mg kg<sup>-1</sup>) to rats did not change the plasma levels of AST, ALT and urea compared to vehicle administration (data not shown). The AST and ALT increases caused by LPS injection, which were 108.7% and 142.6% above the control values, respectively, were accompanied by an increase of 146.8% in the plasma urea concentration (Figure 2B-D). Pre-treatment with FM, as revealed by Figures 2B and 2C, reduced the increments in the plasma levels of both AST and ALT. The first one was reduced by 36% and 31%, respectively, by FM 1.1 and 2.2 mg kg<sup>-1</sup>, whereas the latter was reduced by 43% and 46%, respectively. The lower dose also reduced the urea levels by 51% (Figure 2D). Post-treatment with FM, on the other hand, was much less effective. Although a tendency toward reduction was seen for all cases, only the plasma levels of AST were significantly reduced (30%) at the higher dosis.

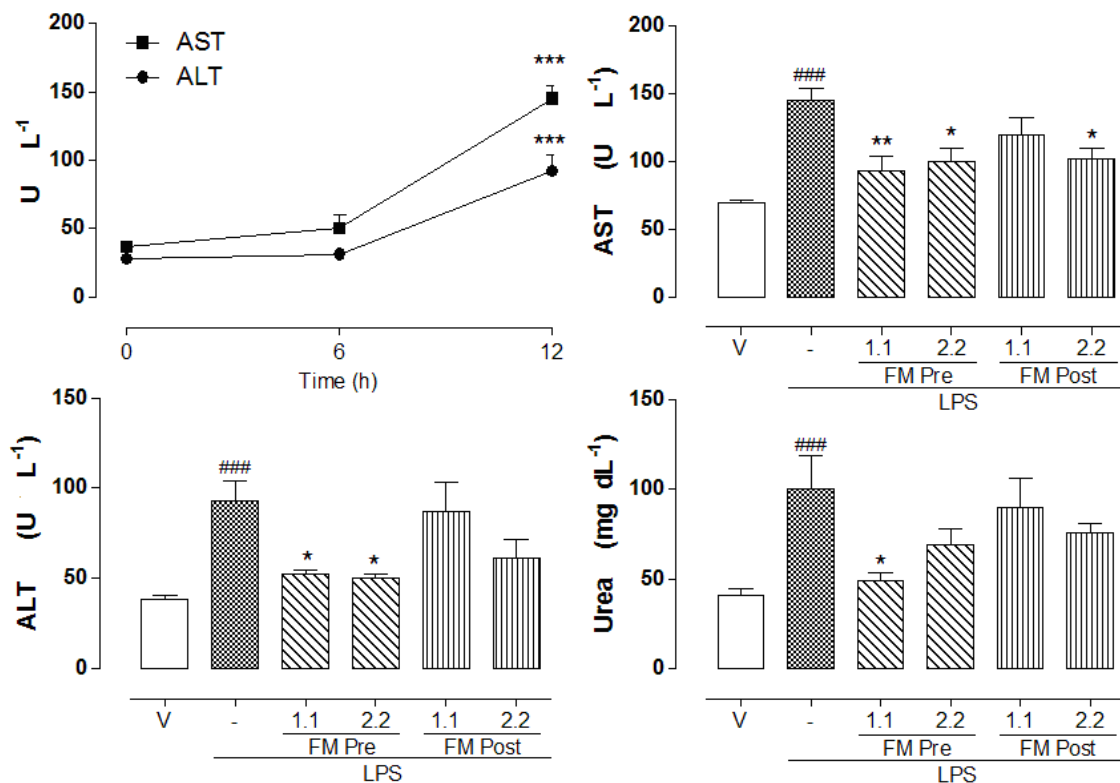


Figure 1. **Effects of FM on the plasma levels of enzymes and urea after sepsis induction.** Animals were injected with phosphate-buffered saline (vehicle, V) or LPS (10 mg kg<sup>-1</sup>). The treatment with FM (1.1 mg kg<sup>-1</sup> or 2.2 mg kg<sup>-1</sup>) was done 2 h before (FM-pre) or 2 h after (FM-post) the injection of LPS. Panel A shows the time-course of alanine aminotranferase (ALT) and aspartate aminotranferase (AST) in the plasma following LPS injection. The following panels show the effect of the FM treatment on the plasma levels of AST (B), ALT(C) and urea (D). Points or bars represent the means  $\pm$  mean standard errors (n = 5). Symbols: \*, statistically different from the LPS-injected group; #, statistically different from the vehicle-injected group (\*p < 0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001, ###p<0.001).

### 3.2. Histological analyses

In a histological analysis of the liver from the animals after the different treatments, vehicle-treated animals showed normal hepatocytes and no un-specific alterations. The administration of FM alone did not change this pattern. Figure 2A-C illustrates the histopathological changes seen 12 h after LPS injection and the effect of the treatment with FM. A semi-quantitative scoring of

these modifications is also shown in Table I. Macroscopically, livers from endotoxemic animals showed a perceptible paleness after 12 h. Microscopically, several changes were observed indicating hepatic lesions after LPS administration, such as apoptotic cells and lobular migration of leukocytes, outbreaks of visible necrosis and tumefacted cells (Figure 2A, Table I).

The treatment with the higher dose of FM, but not at lower dose, 2h after the LPS injection significantly reduced leukocyte infiltration but not the outbreaks of necrosis and apoptosis. Conversely, the pre-treatment with FM was very effective in attenuating the hepatotoxicity induced by LPS in the liver, especially at the lower dose. Leukocyte infiltration was reduced in both doses and in lower dose the outbreaks of necrosis were abolished (Figure2C).

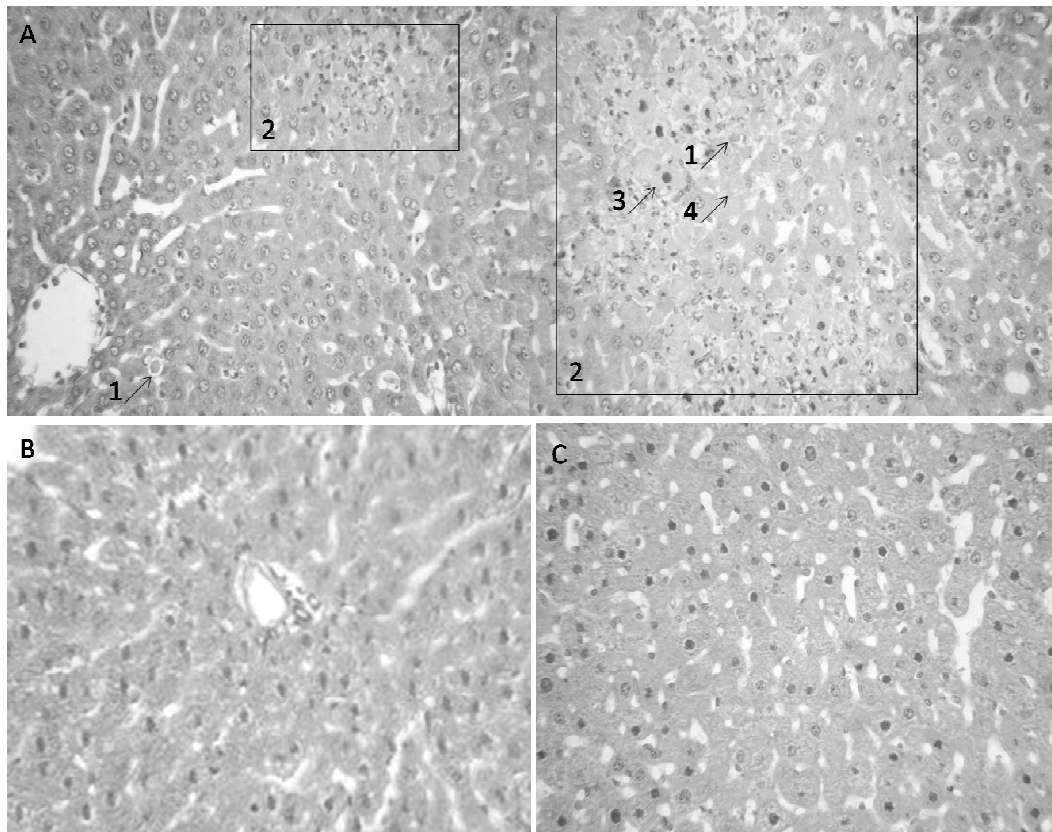


Figure 2. **Histopathological changes induced by LPS in the liver tissue (12 h after injection) and the effects of FM.** Sections were prepared and stained with hematoxylin and eosin as described in Materials and Methods (400x magnification). In A, section from LPS-treated rats; arrow 1 indicates apoptotic cell, area 2 delimits great outbreaks of necrosis, arrow 3 indicates tumefaction and arrow 4 indicates microsteatosis. In B, section from normal rats. In C, sections from animals treated with FM (1.1 mg kg<sup>-1</sup>) 2 h before LPS injection, in which outbreaks of necrosis caused by LPS were abolished.

**Table 1**

**Histopathological changes caused by LPS and action of FM pre- and post-treatment at 12 h.** Semi-quantitative scoring of the light microscopy observations of hepatic tissue sections stained with hematoxylin-eosin as illustrated by Figure 2.

Alterations	LPS	FM pre-treatment		FM post-treatment	
		1.1 mg kg <sup>-1</sup>	2.2 mg kg <sup>-1</sup>	1.1 mg kg <sup>-1</sup>	2.2 mg kg <sup>-1</sup>
Drop-like microsteatosis	+	+	+		
Apoptosis	++++	++		++++	++
Necrosis outbreaks	++++		+ / ++	++++	++
Portal mononuclear infiltrate	+++		+	+++	
Portal polymorphonuclear infiltrate	+++			+++	
Lobular mononuclear infiltrate	+++			+++	
Lobular polymorphonuclear infiltrate	+++			+++	
Tumefaction	+				
Hepatocytolysis	+			+	

### 3.3. Evaluation of the DPP+ reductive activity of FM

FM was effective in preventing, partly at least, the LPS-induced alterations in cell integrity and plasma enzymes. Since it is believed that oxidative stress can be a determinant factor in the induction of these changes, the DPP+ reductive activity capacity of FM was evaluated. The results are shown in Figure 3. FM presented reductive activity in the concentration range of 100 to 1000 µg mL<sup>-1</sup>. An activity similar to that of the positive control ascorbic acid was found for the FM concentrations of 300 and 1000 µg mL<sup>-1</sup>.

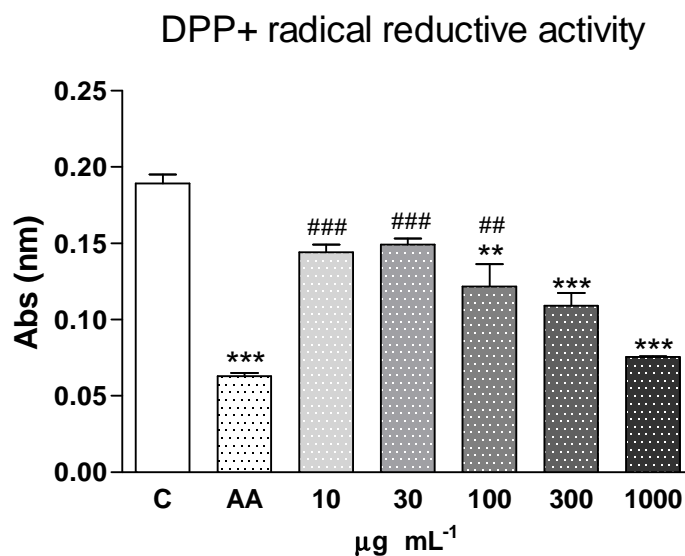


Figure 3. **Evaluation of the DPP+ reductive activity of FM in the range between 10 and 1000 µg/mL.** Water was used as a negative control (C). Ascorbic acid (AA; 50 mg mL<sup>-1</sup>) was used as a positive control. The absorbance data represent the means ± mean standard errors. Symbols: \*, statistically different from C; #, statistically different from AA (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, ##p<0.01, ###p<0.001).

### 3.4. Effects of FM on hepatic oxidative stress parameters

To examine the effect of FM on liver oxidative stress parameters in LPS-treated rats the SOD and CAT activities and the GSH and lipid peroxidation levels were measured. The administration of FM alone did not change the CAT activity, the GSH concentration and the lipid peroxidation levels (data not shown). However, the SOD activity was increased by approximately 55% when 1.1 mg kg<sup>-1</sup> were administered. No such changes were found with the 2.2 mg kg<sup>-1</sup> dose (data not shown). LPS injection, on the other hand, resulted in substantial increases in the SOD and CAT activities and in the lipid peroxidation levels after 12h (90%, 31% and 498%, respectively; Figs. 4A-B and D). LPS injection also reduced the GSH levels (49%; Fig. 4C). The pre-treatment with FM 2 h before LPS injection reduced the increases caused by LPS in the CAT and SOD activities and in the lipid peroxidation (Fig. 4A-D). The reduction occurred with both the 1.1 and 2.2 mg kg<sup>-1</sup> doses, the reductions of the CAT activity being 43% and 33%, those of the SOD activity 34% and 27%, and those of the lipid

peroxidation 52% and 59%, respectively. A partial restoration of the GSH levels, however, was found only with the 1.1 mg kg<sup>-1</sup> dose of FM (50% increase relative to the LPS level; Fig 4C). The post-treatment with FM was also effective on the SOD and CAT activities and on the lipid peroxidation levels, but generally only at the dose of 2.2 mg kg<sup>-1</sup>. With this dose the SOD and CAT activities were reduced by 35% and 30%, respectively. The lipid peroxidation levels were 71% reduced by the 2.2 mg kg<sup>-1</sup> dose.

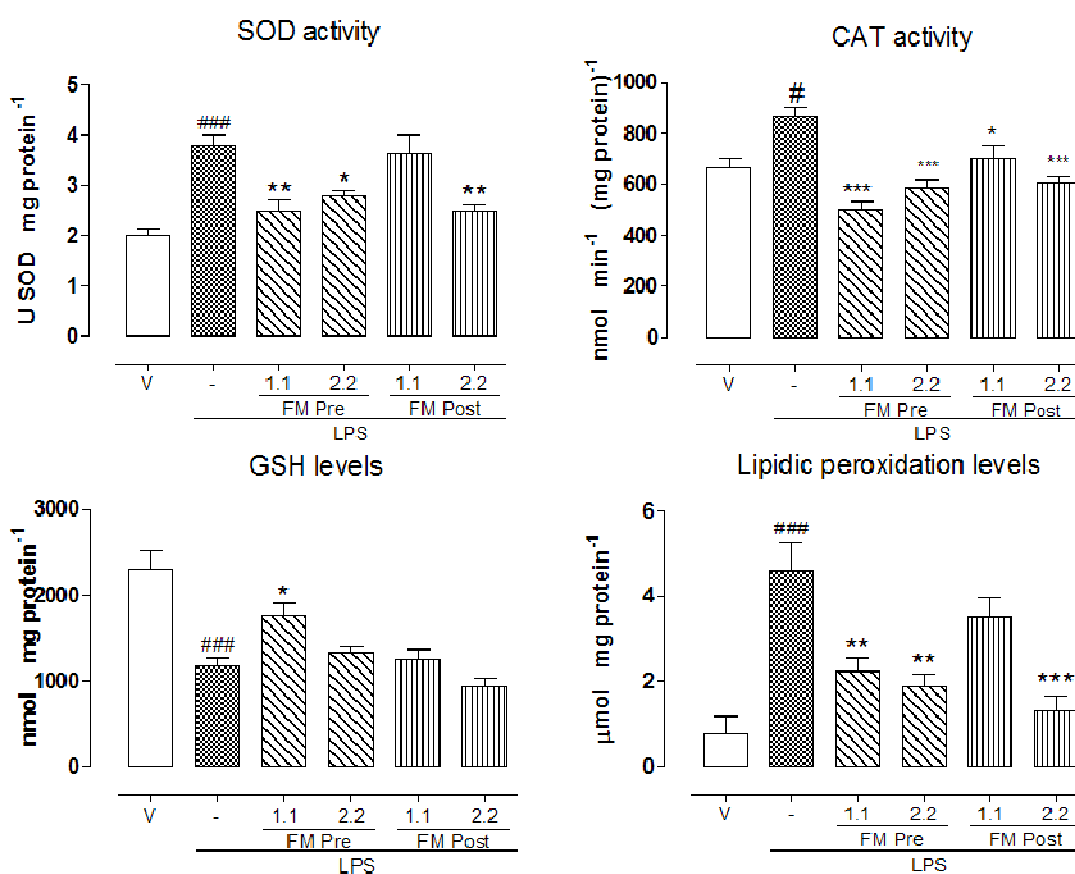


Figure 4. **Effect of FM on liver SOD and CAT enzymatic activity, lipid peroxidation and GSH levels after sepsis.** Animals were injected with phosphate-buffered saline (vehicle, V) or LPS (10 mg kg<sup>-1</sup>). The treatment with FM 1.1 mg kg<sup>-1</sup> or 2.2 mg kg<sup>-1</sup> was done 2 h before (FM-pre) or 2 h after (FM-post) the injection of LPS. The activity of SOD (A), CAT (B) and the levels of GSH (C) and lipid peroxidation (D) are shown. Bars show the mean  $\pm$  mean standard errors (n = 5). Symbols: \*, statistically different from the LPS-injected group; #, statistically different from the vehicle-injected group (\*p<0.05 \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, #p<0.05 ###p<0.001).

### 3.5. Effect of FM on hepatic gluconeogenesis and ureagenesis

Hepatic gluconeogenesis and ureagenesis have been found to be diminished in sepsis [7, 9]. Since the pre-treatment with the lower dose of FM ( $1.1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) seemed to be effective in reverting, partly at least, some of the hepatic changes caused by LPS, we evaluated the effect of this dose of FM on gluconeogenesis and ureagenesis. The results of perfusion experiments in which alanine was infused as the gluconeogenic and ureogenic substrate are shown in Figure 5 and Table 2.

Figure 5 shows the time courses of the changes in three selected parameters in livers of vehicle, LPS, FM and LPS+FM injected rats. The rates of urea production were practically the same for all conditions before the onset of alanine infusion. The rates of oxygen uptake and glucose production before alanine tended to be different. In the case of glucose release they were clearly higher in livers from rats injected with FM alone or with FM+LPS. The infusion of alanine produced progressive increases in the metabolic parameters toward new steady-states. In livers from LPS injected rats all three parameters shown in Figure 5 presented lower steady-states when compared to the control condition (vehicle injected rats). In the case of oxygen uptake this was clearly the consequence of both the lower basal rates and the lower response to alanine. In the case of glucose and urea production it was basically due to the lower response to alanine. In all cases also pre-treatment with FM tended to increase the final steady-states in LPS injected rats. Glucose and urea production responded differently in rats injected solely with FM. The final steady-state rates of glucose release in the livers from FM injected rats tended to remain well above those in the livers from control rats, the opposite occurring with the rates of urea production.

Table 2 presents the final increments caused by alanine in the parameters shown in Figure 4 as well as those in ammonia, lactate and pyruvate production. These increments were calculated as [final values at the end of the alanine infusion period] – [basal rates before alanine infusion] and represent, thus, the liver response to alanine. LPS clearly diminished the increments caused by alanine in glucose production ( $-81.6\%$ ), urea production ( $-57.3\%$ ) and oxygen uptake ( $-73.0\%$ ). The increments in lactate, pyruvate and ammonia productions, however, were not affected by LPS. Flunixin treatment of LPS injected rats (LPS

+ FM) restored in part the hepatic responses of gluconeogenesis and ureagenesis to alanine. Gluconeogenesis, for example, although still 34.2% depressed relative to the control condition, was 257% increased relative to the LPS condition. The oxygen uptake increment also tended to be restored by FM, but statistical significance was lacking. It should be remarked that the injection of FM alone caused a 70.3% reduction in ammonia production and a 61.1% reduction in pyruvate production. This contrasts with the observation that these parameters were normal in livers from LPS and LPS + FM injected rats.

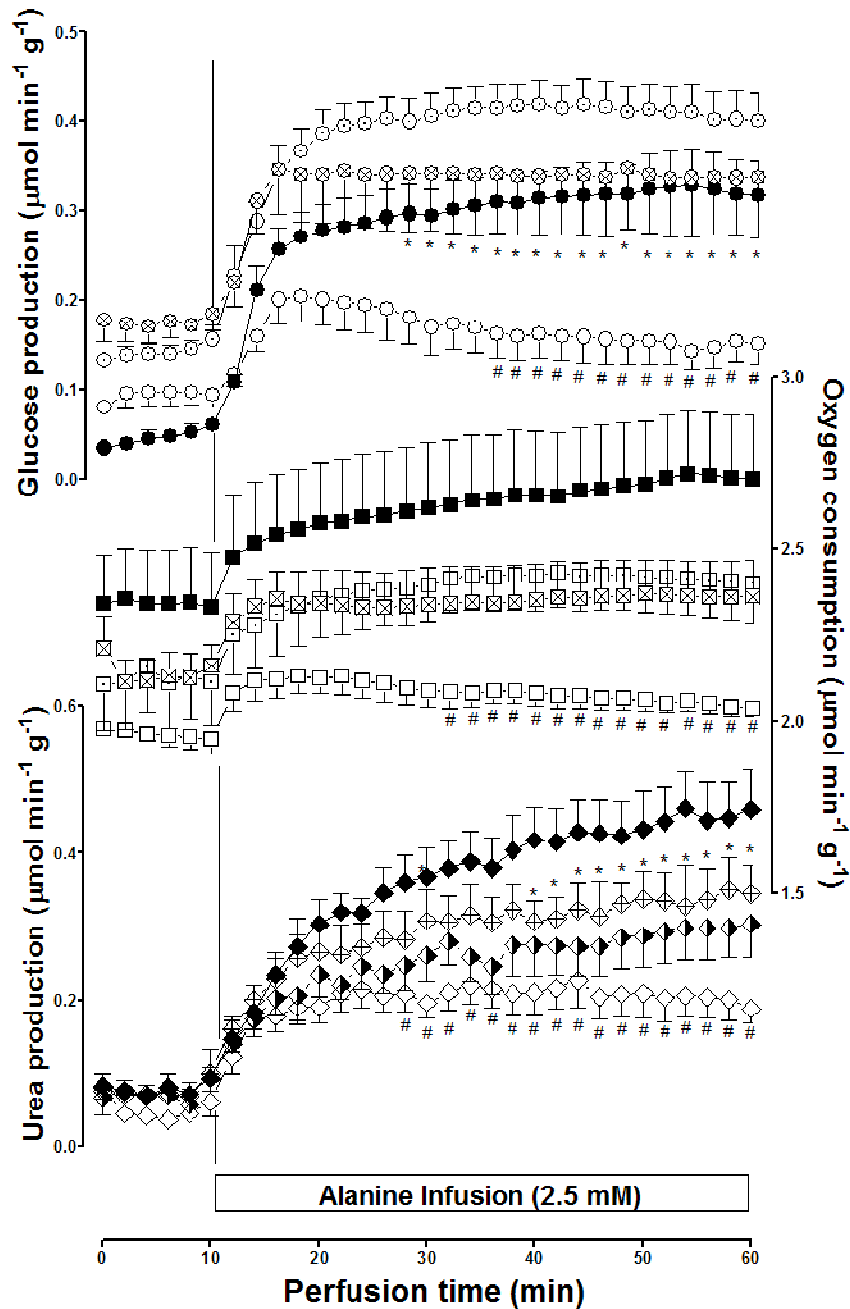


Figure 5. **Time-courses of hepatic glucose and urea productions and oxygen uptake: influence of LPS-induced sepsis and flunixin-meglumin (FM).** Fasted rats (18 h) were injected with phosphate-buffered saline or LPS ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ). The treatment with FM  $1.1 \text{ mg kg}^{-1}$  was done 2 hours before the injection of LPS. After 12 hours the livers were isolated and perfused in a non-recirculating system. Zero time corresponds to the time at which sampling of the outflowing perfusate was initiated after oxygen consumption stabilization. Alanine infusion was started at 10 min. Data points are the means  $\pm$  mean standard errors ( $n=5$ ). Glucose production symbols: control,  $\bullet$ — $\bullet$ ; LPS,  $\circ$ — $\circ$ ; LPS + FM,  $\otimes$ — $\otimes$ ; FM,  $\odot$ — $\odot$ . Oxygen uptake symbols: control,  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ; LPS,  $\square$ — $\square$ ; LPS + FM,  $\boxtimes$ — $\boxtimes$ ; FM,  $\square$ — $\square$ . Urea production symbols: control,  $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$ ; LPS,  $\diamond$ — $\diamond$ ; LPS + FM,  $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$ ; FM,  $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$ . Statistical symbols: \*, statistically different from the LPS-injected group ( $p \leq 0.05$ ); #, statistically different from the vehicle-injected group ( $p \leq 0.05$ ).

**Table 2**

**Influence of the LPS and the flunixin meglumine (FM) on alanine metabolism.** Fasted rats were injected with saline (control), LPS (10 mg kg<sup>-1</sup>), FM (1.1 mg kg<sup>-1</sup>) or LPS + FM. After 12 hours the livers were perfused according to the protocol described in Material and Methods. Samples of the effluent perfusate were collected for metabolite assay. Oxygen uptake was followed polarographically. The data represent the mean  $\pm$  mean standard errors of the changes that occurred upon 2.5 mM alanine infusion. The latter were calculated as [final values at the end of the alanine infusion period] – [basal rates before alanine infusion]. Variance analysis was done followed by Newman-Keuls Multiple Comparison test. Legends: \*, differs from the LPS group ( $p \leq 0.05$ ); #, differs from vehicle group ( $^{\#}p \leq 0.05$ ,  $^{\#\#}p \leq 0.01$ ,  $^{\#\#\#}p \leq 0.001$ ).

<b>Metabolic parameters: changes upon 2.5 mM alanine infusion</b>	Vehicle (n=5)	LPS (n=5)	LPS + FM (n=5)	FM (n=5)
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$			
Glucose production	0.266 $\pm$ 0.038	0.049 $\pm$ 0.010 <sup>###</sup>	0.175 $\pm$ 0.047*	0.273 $\pm$ 0.020
Oxygen uptake	0.408 $\pm$ 0.056	0.110 $\pm$ 0.030 <sup>#</sup>	0.260 $\pm$ 0.047	0.344 $\pm$ 0.079
Lactate production	0.336 $\pm$ 0.049	0.269 $\pm$ 0.073	0.337 $\pm$ 0.027	0.216 $\pm$ 0.050
Pyruvate production	0.237 $\pm$ 0.021	0.238 $\pm$ 0.046	0.204 $\pm$ 0.017	0.092 $\pm$ 0.038 <sup>#</sup>
Ammonia production	0.192 $\pm$ 0.028	0.173 $\pm$ 0.075	0.209 $\pm$ 0.021	0.057 $\pm$ 0.019 <sup>#</sup>
Urea production	0.349 $\pm$ 0.037	0.149 $\pm$ 0.017 <sup>##</sup>	0.272 $\pm$ 0.035*	0.219 $\pm$ 0.038

## 4. Discussion

In this study we showed that treatment of rats with FM, an NSAID commonly used in the veterinary clinics, was effective in reversing, partly at least, most alterations induced by LPS. Confirming previous reports [40, 41], the alterations caused by LPS-induced sepsis were increased plasma levels of AST and ALT, leukocyte migration, cell death and hepatic tissue alterations such as apoptosis, necrosis and leucocyte infiltrations. The action of FM was more effective when it was given before LPS injection. There are indications that liver damage caused by sepsis can be in part the consequence of oxidative stress. Under physiological conditions, a homeostatic balance exists between the formation of ROS (reactive oxygen species) and their removal by endogenous antioxidant scavenging compounds [42]. Oxidative stress may occur when this balance is disrupted by excessive production of ROS, including  $\cdot\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\cdot\text{OH}$ , and/or inadequate antioxidant defenses by changes in superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities and reduced glutathione (GSH) levels [43]. Increased levels of ROS in the liver after LPS challenge have been demonstrated in different models of sepsis [15, 44, 45] and this disturbance may lead to DNA, protein or lipid damage resulting in apoptosis and necrosis followed by cell death [15, 44, 45]. Therefore, the release of AST and ALT into the plasma that was found after 12 h may result from an increased cell permeability or even hepatocyte disruption through the action of the free radicals [46, 47].

In sepsis, there are several potential sources of ROS, including the mitochondrial electron transport chain, xanthine oxidase activation as a result of ischaemia and reperfusion, the respiratory burst associated with immune cell activation, arachidonic acid metabolism and NADPH oxidase [45]. Antioxidant activity has also been attributed to some NSAIDS in addition to their anti-inflammatory activity. This leads one to expect that these substances could be clinically useful in sepsis treatment [28]. Corroborating this view we found in the present study that FM possesses reductive capacity *in vitro* by using the DPPH scavenger test. Prevention of liver damage by FM may result, partly at least, from this mechanism.

Our results confirm that the SOD and CAT activities in the liver increase after LPS administration [48]. Induction of these enzymes was probably necessary for host defense. The treatment with FM, on the other hand, reduced these

increased levels of SOD (indicating a decrease in the release or concentration of  $\cdot\text{O}_2$  in the cell) and CAT. Treatment with FM also diminished the lipid peroxidation which was increased by LPS. All these results indicate that the overall production of ROS by the liver was diminished by FM. A surprising observation was that the treatment with  $1.1 \text{ mg kg}^{-1}$  FM without LPS increased the levels of SOD in vivo. This could be related to the well known uncoupling effects generally exerted by NSAIDs, which affects mitochondrial ATP production and increases the generation of ROS [49]. However, this effect does not seem to be important during sepsis.

Another observation of the present work was that FM alleviated the depletion of glutathione caused by sepsis. This is in line with an earlier observation [50]. The glutathione turnover is increased early in sepsis, with increased GSH synthesis in many tissues (especially the liver) but with lower blood GSH concentrations [45, 51]. Recent studies have demonstrated that endogenous glutathione plays an important role in reducing vascular hyporeactivity and endothelial dysfunction in response to peroxynitrite and sepsis, as well as in acute inflammation. Suppression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  synthesis could be a further mechanism of action of FM. Those cytokines have their synthesis induced through NF- $\kappa$ B activation and there are suggestions that FM can inhibit NF- $\kappa$ B activation [14]. It is well known that TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  induce ROS production in many cell types [15] but the damage caused by these reactive oxygen species may further increase the production of these cytokines [52].

The liver perfusion experiments were done in order to verify if FM can also improve the liver function which is known to be impaired by sepsis, with decreases in oxygen consumption, glucose production and urea production [7-9]. In overall terms the results allow to conclude that FM was able to revert the impaired gluconeogenesis and ureagenesis from alanine. It should be remarked that the first step in alanine transformation consists in a transamination reaction catalyzed by ALT. The presence of ALT in blood may indicate cellular rupture and loss of tissue function, which would lead to a decrease in alanine transformation [53]. On the other hand, AST is also very important in transamination reactions during the urea cycle in the mitochondria converting products of amino acid metabolism [53]. Therefore, the presence of AST in blood may also indicate mitochondrial rupture and slowing down of transamination reactions involving aspartate, a phenomenon that can also impair ureagenesis. Interestingly,

plasmatic urea was increased 12 h after LPS injection, which points to renal failure and difficulties in metabolite excretion [54].

Partial restoration of the sepsis impaired gluconeogenic and ureagenic activity of the liver were the most prominent effects of FM, but the compound also exerted effects which were not related to the pathology. The administration of FM alone, for example, increased the basal glucose release, i.e., before alanine infusion. Since no gluconeogenic substrates were present during this period, the phenomenon could be reflecting increased hepatic glycogen stores. Also, the administration of FM alone reduced the production of pyruvate and ammonia in the perfused liver. However, they seem not to be important during sepsis.

In conclusion, our data have shown that sepsis may lead to severe liver damage, affecting both structure and function, and that the treatment with FM can be used to avoid this damage. Pre-treatment of the animals was more effective than the post-treatment (after sepsis was induced by LPS) but even some improvement in the liver condition was seen when FM was given 2 h after endotoxemia induction.

## **Acknowledgements**

We would like to express our gratitude to Aparecida Pinto Munhos Hermoso, Irene Aparecida Bernardino and Luis Saraiva Arraes for their help in the liver perfusion experiments. The present work was supported by grants from CNPq, CAPES and Fundação Araucária-PR.

## References

1. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997;112:235-43.
2. Brix-Christensen V, Andersen SK, Andersen R, Mengel A, Dyhr T, Andersen NT, et al. Acute hyperinsulinemia restrains endotoxin-induced systemic inflammatory response: an experimental study in a porcine model. *Anesthesiology*. 2004;100:861-70.
3. Marik PE, Raghavan M. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Med*. 2004;30:748-56.
4. Marik PE, Zaloga GP. Therapeutic sedation: has its time come? *Crit Care Med*. 2002;30:949-52.
5. Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk HC, Jr. Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection. *Arch Surg*. 1980;115:136-40.
6. Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA*. 1994;271:226-33.
7. Ardawi MS, Ashy AA, Jamal YS, Khoja SM. Metabolic control of hepatic gluconeogenesis in response to sepsis. *J Lab Clin Med*. 1989;114:579-86.
8. Chang CK, Moskal SF, 2nd, Srivenugopal KS, Schumer W. Altered levels of mRNA encoding enzymes of hepatic glucose metabolism in septic rats. *Circ Shock*. 1993;41:35-9.
9. Crouser ED, Dorinsky PM. Metabolic consequences of sepsis. Correlation with altered intracellular calcium homeostasis. *Clin Chest Med*. 1996;17:249-61.
10. Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286:G769-76.
11. Salkowski CA, Detore G, Franks A, Falk MC, Vogel SN. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. *Infect Immun*. 1998;66:3569-78.
12. Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T. Changes in the levels of endogenous antioxidants in the liver of mice with experimental endotoxemia and the protective effects of the antioxidants. *Surgery*. 1989;105:200-6.
13. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:1620-4.
14. Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg*. 1992;216:117-34.

15. Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1173-85.
16. Bhattacharyya S, Brown DE, Brewer JA, Vogt SK, Muglia LJ. Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood.* 2007;109:4313-9.
17. Chen HW, Kuo HT, Chai CY, Ou JL, Yang RC. Pretreatment of curcumin attenuates coagulopathy and renal injury in LPS-induced endotoxemia. *J Endotoxin Res.* 2007;13:15-23.
18. Yazar E, Er A, Uney K, Altunok V, Elmas M. Effect of flunixin meglumine on cytokine levels in experimental endotoxemia in mice. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2007;54:352-5.
19. Cheng PY, Lee YM, Wu YS, Chang TW, Jin JS, Yen MH. Protective effect of baicalein against endotoxic shock in rats in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:793-804.
20. Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int.* 2008;52:447-56.
21. Hevia H, Varela-Rey M, Corrales FJ, Berasain C, Martinez-Chantar ML, Latasa MU, et al. 5'-methylthioadenosine modulates the inflammatory response to endotoxin in mice and in rat hepatocytes. *Hepatology.* 2004;39:1088-98.
22. Lee SJ, Lim KT. Inhibitory effect of 30-kDa phytolectin on expression of TNF-alpha and COX-2 via activation of PKCalpha and ERK 1/2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Mol Cell Biochem.* 2008;317:151-9.
23. Balk RA. Optimum treatment of severe sepsis and septic shock: evidence in support of the recommendations. *Dis Mon.* 2004;50:168-213.
24. Toutain PL, Autefage A, Legrand C, Alvinerie M. Plasma concentrations and therapeutic efficacy of phenylbutazone and flunixin meglumine in the horse: pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *J Vet Pharmacol Ther.* 1994;17:459-69.
25. Luthman J, Kindahl H, Jacobsson SO. The influence of flunixin on the response to *Salmonella typhimurium* endotoxin in calves. *Acta Vet Scand.* 1989;30:295-300.
26. Daels PF, Stabenfeldt GH, Hughes JP, Odensvik K, Kindahl H. Effects of flunixin meglumine on endotoxin-induced prostaglandin F2 alpha secretion during early pregnancy in mares. *Am J Vet Res.* 1991;52:276-81.
27. Little D, Brown SA, Campbell NB, Moeser AJ, Davis JL, Blikslager AT. Effects of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on recovery of ischemia-injured equine jejunum. *Am J Vet Res.* 2007;68:614-24.
28. Mouithys-Mickalad AM, Zheng SX, Deby-Dupont GP, Deby CM, Lamy MM, Reginster JY, et al. In vitro study of the antioxidant properties of non steroidal

anti-inflammatory drugs by chemiluminescence and electron spin resonance (ESR). *Free Radic Res.* 2000;33:607-21.

29. Drury RAB, Wallington, E.A., 1980. Preparation and fixation of tissues. *Carletons Histological Tecnique*, 5th ed. Oxford Univ. Press, Oxford.

30. Culling CFA, Allison, R.T., Barr, W.T., 1985. *Cellular Pathology Technique*: Butterworth and Co., London.

31. Beutler E, Litchman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.J., 1995. *Hematology*: McGraw Hill, New York.

32. Cheng Z, Moore J, Yu L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *J Agric Food Chem.* 2006;54:7429-36.

33. Gao RM, Yuan ZB, Zhao ZQ, Gao XR. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* 1998;45:41-5.

34. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.

35. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids.* 1991;26:853-6.

36. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25:192-205.

37. Scholz R, Hansen W, Thurman RG. Interaction of mixed-function oxidation with biosynthetic processes. 1. Inhibition of gluconeogenesis by aminopyrine in perfused rat liver. *Eur J Biochem.* 1973;38:64-72.

38. Bergmeyer HU, 1974. *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, London, pp. 1794-1801.

39. Bracht A, Ishii-Iwamoto, E.L., 2003. *Métodos de laboratório em Bioquímica*. Manole, São Paulo, pp.275-289.

40. Hsu DZ, Li YH, Chien SP, Liu MY. Effects of sesame oil on oxidative stress and hepatic injury after cecal ligation and puncture in rats. *Shock.* 2004;21:466-9.

41. Neyrinck AM, Mouson A, Delzenne NM. Dietary supplementation with laminarin, a fermentable marine beta (1-3) glucan, protects against hepatotoxicity induced by LPS in rat by modulating immune response in the hepatic tissue. *Int Immunopharmacol.* 2007;7:1497-506.

42. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull.* 1999;55:49-75.

43. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41:1819-28.

44. Sakaguchi S, Furusawa S. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47:167-77.
45. Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol*. 2004;4:327-47.
46. Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys*. 1997;345:278-88.
47. Munker R, Greither L, Darsow M, Ellwart JW, Mailhammer R, Wilmanns W. Effects of tumor necrosis-factor on primary human leukemia cells: ultrastructural changes. *Acta Haematol*. 1993;90:77-83.
48. Portoles MT, Catala M, Anton A, Pagani R. Hepatic response to the oxidative stress induced by *E. coli* endotoxin: glutathione as an index of the acute phase during the endotoxic shock. *Mol Cell Biochem*. 1996;159:115-21.
49. Galati G, Tafazoli S, Sabzevari O, Chan TS, O'Brien PJ. Idiosyncratic NSAID drug induced oxidative stress. *Chem Biol Interact*. 2002;142:25-41.
50. Konyalioglu S, Er A, Uney K, Elmas M, Yazar E. Effect of flunixin meglumin on the antioxidant status in endotoxemia. *Acta veterinaria (beograd)*, vol 57, no 2-3, 241-246, 2007.
51. Carbonell LF, Nadal JA, Llanos MC, Hernandez I, Nava E, Diaz J. Depletion of liver glutathione potentiates the oxidative stress and decreases nitric oxide synthesis in a rat endotoxin shock model. *Crit Care Med*. 2000;28:2002-6.
52. Zhang GG, Bai YP, Chen MF, Shi RZ, Jiang DJ, Fu QM, et al. Asymmetric dimethylarginine induces TNF-alpha production via ROS/NF-kappaB dependent pathway in human monocytic cells and the inhibitory effect of reinoside C. *Vascul Pharmacol*. 2008;48:115-21.
53. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: Worth, 2005. 1200 p.
54. Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, Bogatsch H, Reinhart K, Frei U, et al. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock--a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:904-9.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

ANDUS, T.; BAUER, J.; GEROK, W. Effects of cytokines on the liver. **Hepatology**, 13, p 364-375, 1991.

ANNANE, D. Glucocorticoids in the treatment of severe sepsis and septic shock. **Curr Opin Crit Care**, 11, 449-453, 2005.

BEAL, A. L.; CERRA, F. B. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. **JAMA**, 271, 226-233, 1994.

BEISHUIZEN, A. I.; VERMES, B. S. H.; HAANEN, C. Relative eosinophilia and functional adrenal insufficiency in critically ill patients. **Lancet**, 353, 1675-1676, 1999.

BERNARD, G. R.; WHEELER, A. P.; RUSSELL, J. A.; SCHEIN, R.; SUMMER, W. R.; STEINBERG, K. P. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. **N Eng J Med** , 336:912-8, 1998.

BEUTLER, B. TNF in pathophysiology: biosynthetic regulation. **J Invest Dermatol**, 95, 81S-84S, 1990.

BOCHUD, P. Y.; GLAUSER, M. P.; CALANDRA, T. Antibiotics in sepsis. **Intensive Care Med**, 27 Suppl 1, S33-48, 2001.

BOGOSSIAN, L. **Choque séptico – Recentes Aquisições da Fisiopatologia e do Tratamento**. ATHENEU Editora. Rio de Janeiro: São Paulo, 1992.

BONE, R. C. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. **Ann Intern Med**, 114, 332-333, 1991.

BONE, R. C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. **Crit Care Med**, 24, 1125-1128, 1996.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA F. B.; DELLINGER, R. P; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A. ; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM

Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, 101, 1644-1655, 1992.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, 112, 235-243, 1997.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. **Am J Physiol**, 272, 1712-1725, 1997.

CARCILLO, J. A.; FIELDS, A. I. Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal patients in septic shock. **Crit Care Med**, 30, 1365-1378, 2002.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 72, 3666-3670, 1975.

CARVALHO, P. R. A.; TROTTA, E. D. A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. **Jornal de Pediatria**, 79, 195-204, 2003.

CICARELLI, D. D.; BENSEÑOR, F. E. M.; VIEIRA, J. E. Effects of single dose of dexamethasone on patients with systemic inflammatory response. **Sao Paulo Medical Journal**, 124, 90-95, 2006.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, 420, 885-891, 2002.

CONNOR, T. J.; O'SULLIVAN, J.; NOLAN, Y.; KELLY, J. P. Inhibition of constitutive nitric oxide production increases the severity of lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a role for TNF- $\alpha$ . **Neuroimmunomodulation**, 10, 367-378, 2002.

COSTELLO, M. F.; OTTO, C. M.; RUBIN, L. J. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and the sphingosine pathway in sepsis-induced myocardial dysfunction. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. 13(1): 25-34, 2003.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 95-99.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D. P.; CAPUTI, A. P.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol Rev**, 53, 135-159, 2001.

DANEK, J. Effects of flunixin meglumine on selected clinicopathologic variables, and serum testosterone concentration in stallions after endotoxin administration. **Vet Med A Physiol Pathol Clin Med**, 53(7) : 357-63, 2006.

DE COSTA, C. M. "The contagiousness of childbed fever": a short history of puerperal sepsis and its treatment. **Med J Aust**, 177, 668-671, 2002.

DE GROOT, H. Reactive oxygen species in tissue injury. **Hepatogastroenterology**, 41, 328-332, 1994.

DE CAMP, M. M.; WARNER, A. E. ; MOLINA, R. M. ; BRAIN, J. D. Hepatic versus pulmonary uptake of particles injected into the portal circulation in sheep. Endotoxin escapes hepatic clearance causing pulmonary inflammation. **Am Rev Respir Dis**, 146, 224-231, 1992.

DEMBIC, Z. Immune system protects integrity of tissues. **Mol Immunol**, 37, 563-569, 2000.

EMMA, L. R.; NATHANIEL, A. W. Reperfusion injury in the equine intestine. 1, 148-162, 2002.

FORNEY, B. C. M. S., VMD. Equine Medications, Revised Edition. **Blood Horse Publications**. Lexington, KY. Copyright 2007.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nat Rev Immunol**, 8, 837-848, 2008.

HARDIE, E. M.; KOLATA, R. J.; RAWLINGS, C. A. Canine septic peritonitis: treatment with flunixin meglumine. **Circulatory Shock**. 1983, 11(2): 159-173, 2008.

HAVEMAN, J. W.; MULLER-KOBOLD, A. C.; COHEN-TERVAERT, J. W.; VAN DEN BERG, A. P.; TULLEKEN, J. E.; KALLENBERG, C. G. M.; THE, T. H. The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for

immunomonitoring and treatment. **The Netherlands Journal of Medicine**, 55:132–141, 1999.

HILL, M.; MCCALLUM, R. Altered transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following endotoxin treatment. **J Clin Invest**, 88, 811-816, 1991.

HOPPER, K.; BATEMAN, S. An updated view of hemostasis: mechanisms of hemostatic dysfunction associated with sepsis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 15 (2):83-91, 2005.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. Reevaluation of the role of cellular hypoxia and bioenergetic failure in sepsis. **JAMA**, 267, 1503-1510, 1992.

INOHARA, N.; OGURA, Y.; CHEN, F. F.; MUTO, A.; NUNEZ, G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. **J Biol Chem**, 276, 2551-2554, 2001.

JOHNSON, V.; GAYNOR, A.; CHAN, D. L.; ROZANSKI, E. Multiple organ dysfunction syndrome in humans and dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 14(3): 158-166, 2004.

KOURILSKY, P.; TRUFFA-BACHI, P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. **Trends Immunol**, 22, 502-509, 2001.

LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D.; COHEN, J.; OPAL, S. M.; VINCENT, J. L.; RAMSAY, G. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med**, 31, 1250-1256, 2003.

LITTLE, D.; BROWN, S. A.; CAMPBELL, N. B.; MOESER, A. J.; DAVIS, J. L.; BLIKSLAGER, A. T. Effects of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on recovery of ischemia-injured equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research**, 68(6): 614-624, 2007.

LITTLE, D.; JONES, S. L.; BLIKSLAGER, A. T. Cyclooxygenase (COX) inhibitors and the intestine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 21(3): 367-377, 2007.

LIU, S. F.; MALIK, A. B. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 290, 622-645, 2006.

LUNA, S. P.; BASÍLIO, A. C.; STEAGALL, P. V.; MACHADO, L. P.; MOUTINHO, F. Q.; TAKAHIRA, R. K.; BRANDÃO, C. V. Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. **Am J Vet Res**. 3:258-64, 2007

MACKAY, R. J. Endotoxemia In : ROBINSON, N. E. (ed), Current therapy in equine medicine, 2ª ed., **W.B. Saunders Company**, Philadelphia, p.54-62, 1987.

MAJNO, G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). **J Infect Dis**, 163, 937-945, 1991.

MATSUDA, N.; HATTORI, Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. **J Pharmacol Sci**, 101, 189-198, 2006.

MCGUINNESS, O. P.; LACY, D. B.; EJIOFOR, J.; BAGBY, G. G. Hepatic release of tumor necrosis factor in the endotoxin-treated conscious dog. **Shock**, 5, 344-348, 1996.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. An ancient system of host defense. **Curr Opin Immunol**, 10, 12-15, 1998.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. Innate immunity. **N Engl J Med**, 343, 338-344, 2000.

MOSELEY, R. H. Sepsis-associated cholestasis. **Gastroenterology**, 112, 302-306, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. Lehninger – **Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

OHTAKE, Y.; CLEMENS, M. G. Interrelationship between hepatic ureagenesis and gluconeogenesis in early sepsis. **Am J Physiol**, 260, E453-458, 1991.

OLD, L. J. Tumor necrosis factor. **Sci Am**, 258, 59-60, 69-75, 1988.

ORLINSKA, U.; NEWTON, R. C. Role of glucose in interleukin-1 beta production by lipopolysaccharide-activated human monocytes. **J Cell Physiol**, 157, 201-208, 1993.

PASTOR, C. M.; SUTER, P. M. Hepatic hemodynamics and cell functions in human and experimental sepsis. **Anesth Analg**, 89, 344-352, 1999.

PENNICA, D.; NEDWIN, G. E.; HAYFLICK, J. S.; SEEBURG, P. H.; DERYNCK, R.; PALLADINO, M. A.; KOHR, W. J.; AGGARWAL, B. B.; GOEDDEL, D. V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, 312, 724-729, 1984.

PINSKY, M. R.; VINCENT, J. L.; DEVIERE, J.; ALEGRE, M.; KAHN, R. J.; DUPONT, E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. **Chest**, 103, 565-575, 1993.

PROULX, F.; FAYON, M.; FARRELL, C. A.; LACROIX, J.; GAUTHIER, M. Epidemiology of sepsis and multiple organ dysfunction syndrome in children. **Chest**, 109, 1033-1037, 1996.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. Sepsis: still going strong. **Arch Med Res**, 36, 672-681, 2005.

RICE, T. W.; BERNARD, G. R. Therapeutic intervention and targets for sepsis. **Annu Rev Med**, 56, 225-248, 2005.

RIEDERMANN, N. C.; GUO, R. F.; WARD, P. A. The enigma of sepsis. **Journal of Clinical Investigation**, 112: 460-467, 2003.

RIETSCHEL, E. T.; BRADE, H.; HOLST, O.; BRADE, L.; MULLER-LOENNIES, S.; MAMAT, U.; ZHRINGER, U.; BECKMANN, F.; SEYDEL, U.; BRANDENBURG, K.; ULMER, A. J.; MATTERN, T.; HEINE, H.; SCHLETTER, J.; LOPPNOW, H.; SCHONBECK, U.; FLAD, H. D.; HAUSCHILDT, S.; SCHADE, U. F.; DI PADOVA, F.; KUSUMOTO, S.; SCHUMANN, R. R. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. **Curr Top Microbiol Immunol**, 216, 39-81, 1996.

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

RIVERS, E., NGUYEN, B.; HAVSTAD, S.; RESSLER, J.; MUZZIN, A.; KNOBLICH, B.; PETERSON, E.; TOMLANOVICH, M. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med**, 345, 1368-1377, 2001.

ROOT, R. K.; LODATO, R. F.; PATRICK, W.; CADE, J. F.; FOTHERINGHAM, N.; MILWEE, S.; VINCENT, J. L.; TORRES, A.; RELLO, J.; NELSON, S. Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. **Crit Care Med**, 31, 367-373, 2003.

SAEZ-LLORENS, X.; MCCRACKEN, G. H. J. Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: current concepts of terminology, pathophysiology, and management. **J Pediatr**, 123, 497-508, 1993.

SAKAGUCHI, S.; FURUSAWA, S. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 47, 167-177, 2006.

SALES JUNIOR, J. A. L. Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. **Rev. bras. ter. intensiva**, São Paulo, v. 18, n. 1, Mar. 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-507X2006000100003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-507X2006000100003&lng=en&nrm=iso)>. acesso em 21 de Julho de 2009.

SALVEMINI, D.; CUZZOCREA, S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. **Free Radic Biol Med**, 33, 1173-1185, 2002.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, 18, 385-405, 2004.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**, 91, 31-38, 1991.

SILVA, E.; OTHERO, J.; SOGAYAR, A. N. B. Consenso Brasileiro de Sepsis: disfunção de múltiplos órgãos. Disponível em: <<http://www.einstein.br/sepsis/pdf/2.html>> Acesso em 05 de Setembro de 2007.

SKIDMORE, B. J.; CHILLER, J. M.; MORRISON, D. C.; WEIGLE, W. O. Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities. **J Immunol**, 114, 770-775, 1975.

SORIANO, F. G. **Sepsis: estudos das alterações celulares, teciduais e orgânicas produzidas por modelos de sepsis experimental. Análise da participação de citocinas e expressão gênica.** 2006. Tese (livre docência) - USP, São Paulo.

STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; BONE, R. C. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. **Crit Care Med**, 21, S447-463, 1993.

TASAKA, A. C. Antiinflamatórios não-estereoidais. In: SPINOSA HS, GÓRNIAK SL, BERNARDI MM. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 4ª ed. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006, 897 p, 257-272.

TITHERADGE, M. A. Nitric oxide in septic shock. **Biochim Biophys Acta**, 1411, 437-455, 1999.

TRACEY, K. J. TNF and other cytokines in the metabolism of septic shock and cachexia. **Clin Nutr**, 11, 1-11, 1992.

ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Annu Rev Immunol**, 13, 437-457, 1995.

VARY, T. C.; KIMBALL, S. R. Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. **Am J Physiol**, 262, C445-452, 1992.

VICTOR, V. M.; ROCHA, M.; DE LA FUENTE, M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. **Int Immunopharmacol**, 4, 327-347, 2004.

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

WANG, A. M.; CREASEY, A. A.; LADNER, M. B.; LIN, L. S.; STRICKLER, J.; VAN ARSDELL, J. N.; YAMAMOTO, R.; MARK, D. F. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. **Science**, 228, 149-154, 1985.

WANG, G.; ZHAO, M.; WANG, E. Effects of glycine and methylprednisolone on hemorrhagic shock in rats. **Chinese Medical Journal**. 117( 9): 1334-1348, 2004.

WALKER, T. G.; CHAN, D. L.; FREEMAN, L. M.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Serial determination of biomarkers of oxidative stress and antioxidant status in dogs with naturally occurring gastric dilatation-volvulus. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. 17(3): 250–256, 2007.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med**, 320, 365-376, 1989.