

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

ALINE MARIA STOLF

**EFEITOS HEPÁTICOS DE ESTATINAS EM MODELO DE SEPSE
POLIMICROBIANA EM RATOS**

CURITIBA
2012

ALINE MARIA STOLF

**EFEITOS HEPÁTICOS DE ESTATINAS EM MODELO DE SEPSE
POLIMICROBIANA EM RATOS**

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^a. Dr^a. Alexandra Acco

Co-orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

**CURITIBA
2012**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

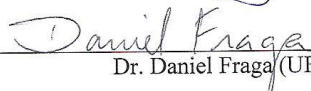


PARECER

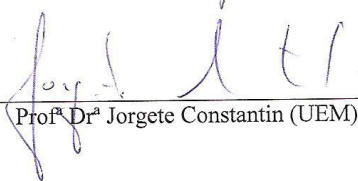
A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado "Efeitos Hepáticos de Estatinas em Modelo de Sepses Polimicrobiana em Ratos", de autoria da pós-graduanda **ALINE MARIA STOLF**, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Acco e composta pelos professores: Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Acco (UFPR), Dr. Daniel Fraga (UFPR) e Prof^ª Dr^ª Jorgete Constantin (UEM). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi Aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 14 de fevereiro de 2011.



Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Acco (Orientadora - UFPR)



Dr. Daniel Fraga (UFPR)



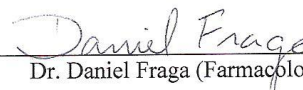
Prof^ª Dr^ª Jorgete Constantin (UEM)



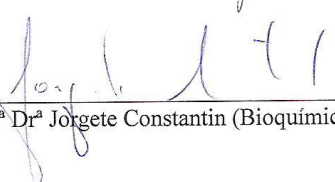
1 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**
2 Ao décimo quarto dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e doze, às oito horas e
3 trinta minutos, no Anfiteatro 14 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal
4 do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da
5 pós-graduanda em Farmacologia **ALINE MARIA STOLF**, intitulada: **“EFEITOS**
6 **HEPÁTICOS DE ESTATINAS EM MODELO DE SEPSE**
7 **POLIMICROBIANA EM RATOS”**, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Alexandra Acco
8 e composta pelos membros: Dr. Daniel Fraga (Farmacologia-UFPR) e Prof^a Dr^a Jorgete
9 Constantin (Bioquímica-UEM). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata
10 teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida
11 argüida durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta
12 minutos para responder a cada uma das argüições. No final a Comissão Examinadora
13 emitiu o seguinte parecer: Aprovado . De acordo com o Regimento
14 Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada.
15 Para a publicação, o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas
16 pelo seu orientador. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão,
17 da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais
18 Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 14 de fevereiro de 2012.



Prof^a. Dr^a. Alexandra Acco (Orientador- UFPR)



Dr. Daniel Fraga (Farmacologia-UFPR)



Prof^a Dr^a Jorgete Constantin (Bioquímica-UEM)

NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação é apresentada em forma de artigo para publicação (modelo alternativo) 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, discussão, e conclusões. O Artigo foi formatado conforme as normas propostas pelo periódico *Shock* ao qual o artigo foi submetido.

De tudo ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.

Fernando Sabino - O encontro marcado.

Agradecimentos

À minha orientadora, professora Alexandra Acco, pelos ensinamentos, paciência e ajuda nos momentos difíceis.

Ao professor Aleksander Zampronio, que sempre esteve presente para esclarecer nossas dúvidas.

À equipe do laboratório de Farmacologia e Metabolismo, e também ao pós-doutorando Daniel Fraga pela participação nos experimentos.

À Yanna Dantas, que com muita calma e boa vontade me ensinou a técnica da CLP, que é a base deste trabalho.

À Amanda Bastos - Pereira e Adriana Oliveira - Christoff, que me ensinaram diversas técnicas laboratoriais.

À professora Silvia Maria S. Cadena e as mestrandas Anna e Lívia pelo auxílio nos experimentos de respiração celular.

Ao professor José Ederaldo Telles, por dividir os seus conhecimentos na leitura das lâminas de histologia.

Ao professor Railson Henneberg, Professora Aline Hauser, e Aline Emmer pelo auxílio nos experimentos de bioquímica sérica.

Ao professor Ronald Oude Elferink, que permitiu a realização dos experimentos de expressão gênica no *Tytgat Institute for Liver and Intestinal Research* – AMC/UvA (Amsterdam – Holanda).

À minha família, pelo apoio de sempre que me permitiu chegar até aqui.

Ao meu noivo, Marc Rul, pelo incentivo, amor e carinho todos estes anos, que foram fundamentais para várias conquistas em minha vida.

Aos amigos que fiz durante a graduação e me acompanham até hoje.

Aos animais que foram utilizados nos experimentos.

Ao Programa REUNI / CAPES pelo indispensável apoio financeiro.

Resumo

Contexto: Diversos dados sugerem benefícios do tratamento com estatinas durante a sepse, mas ainda não existe um consenso a respeito disso na literatura. O objetivo principal deste trabalho foi investigar os efeitos do tratamento prolongado com estatinas em sepse, dando ênfase em suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e metabólicas.

Desenho experimental: Ratos Wistar machos foram tratados com simvastatina (1,17 ou 5,85 mg/kg), atorvastatina (0,59 ou 2,95 mg/kg) ou veículo uma vez ao dia, por gavagem. Após 30 dias de tratamento, foi induzida a sepse pelo modelo de ligadura e punção do ceco (CLP) nos grupos Controle, Simvastatina e Atorvastatina (n=6). O grupo Sham (n=6), que também recebeu veículo, foi submetido apenas à laparotomia. Os grupos Simvastatina Basal e Atorvastatina Basal receberam 5,85 mg/Kg e 2,95 mg/kg, respectivamente (n=5), mas não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico. Passadas 24 horas da CLP ou laparotomia, os animais foram anestesiados novamente para coleta de amostras (fígado e sangue). Ensaios foram feitos para avaliar o estresse oxidativo hepático (catalase, superóxido dismutase, glutationa-S-transferase, glutationa reduzida e peroxidação lipídica), histologia hepática, atividade de enzimas mitocondriais hepáticas, migração leucocitária, contagem de leucócitos no sangue, expressão gênica de superóxido dismutase e TNF α no fígado, bioquímica sérica (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, colesterol e triglicerídeos) e nível plasmático de TNF α .

Resultados: A maior parte dos parâmetros testados demonstrou alterações compatíveis com a condição de sepse. Neste estudo o único parâmetro capaz de evidenciar algum benefício proporcionado pelo tratamento com as estatinas em ratos submetidos ao modelo da CLP foi a atividade enzimática mitocondrial. Nos demais parâmetros, a simvastatina e a atorvastatina não protegeram o fígado contra as injúrias causadas pela indução da sepse polimicrobiana.

Conclusão: Ambas as estatinas quando usadas isoladamente por 30 dias antes da indução de sepse pelo modelo de CLP parecem melhorar a atividade mitocondrial, mas esse resultado não se repetiu em outros marcadores de função hepática e migração leucocitária durante a sepse. Mais estudos devem ser realizados para avaliar a combinação de estatinas com outras drogas utilizadas no tratamento dessa condição patológica.

Palavras-chave: sepse, fígado, estatinas, simvastatina e atorvastatina.

Abstract

Background: Several data suggest beneficial effects of treatment with statins during sepsis, but there is not yet a consensus in scientific literature about that. The major objective of this study was to investigate the effects of long-term statins treatment on hepatic parameters during sepsis, focusing its antioxidant, antiinflammatory and metabolic properties.

Experimental approach: Male Wistar rats were treated orally with simvastatin (1.17 or 5.85 mg/kg), atorvastatin (0.59 or 2.95 mg/kg) or vehicle once a day. After 30 days of treatment, sepsis was induced by CLP on Control, Simvastatin and Atorvastatin groups (n=6). Sham group (n=6), which also received vehicle, was submitted only to laparotomy. Basal Simvastatin and Basal Atorvastatin groups also received 5.85 mg/Kg and 2.95 mg/kg, respectively (n=5), but these animals were not submitted to any surgical procedure. After 24 hours of CLP or laparotomy, the animals were anaesthetized for sample collection (hepatic tissues and blood). Assays were performed to evaluate hepatic oxidative stress (catalase, superoxide dismutase, glutathione-S-transferase, reduced glutathione and lipid peroxidation), liver histology, activity of hepatic mitochondria enzymes, leukocyte migration, leukocyte count on blood, gene expression of hepatic superoxide dismutase and $TNF\alpha$, plasmatic biochemistry (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, cholesterol and triglycerides) and plasmatic level of $TNF\alpha$.

Results: Most of the parameters tested showed alterations compatible with sepsis outcome. However, only liver mitochondrial enzymatic activity presented improvement with statins treatment in rat submitted to sepsis conditions. In other parameters, simvastatin and atorvastatin failed to protect liver against injuries of CLP polimicrobial sepsis model.

Conclusion: The treatment with simvastatin and atorvastatin during 30 days as single drug before inducing CLP seems to improve liver enzymatic mitochondria activity, but this result was not reproducible in other biomarkers of liver function and leukocytes migration during sepsis. Future studies should be encouraged to evaluate the combination of statins with other drugs used in the therapy of sepsis.

Key words: sepsis, liver, statins, simvastatin, atorvastatin.

Lista de figuras

Figura 1: Eventos e mediadores envolvidos na fisiopatogenia e progressão da sepse.
.....16

Artigo científico

Figure 1. Parameters of plasma biochemistry measured 24 hours after CLP model in rats submitted to 30 days-treatment with statins. 33

Figure 2. Biomarkers of hepatic oxidative stress on samples collected 24 h after CLP model in rats submitted to 30 days-treatment with statins. 34

Figure 3. Mitochondrial enzymatic activity on liver of rats treated with statins and submitted to CLP model.35

Figure 4. Hepatic histology evidenced 24 h after CLP model in rats previously submitted to 30-days statins treatment.....36

Figure 5. Leukocyte in blood (A, B and C) and peritoneal liquid (D, E and F) in response to the CLP model and treatment with statins in rats.....38

Figure 6. Gene expression of hepatic *SOD-1* and *TNF-2* and plasmatic level of $TNF\alpha$ in response to the CLP model and treatment with statins..... 39

Lista de tabelas

Artigo científico

Table 1. Hepatic histology lesions found 24 h after CLP model in rats previously submitted to 30-days statins treatment.....	37
--	----

Lista de abreviaturas

SIRS: Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
UTIs: Unidades de Tratamento Intensivo
PaCO₂: Pressão de CO₂ na artéria pulmonar
TNF α : Fator de necrose tumoral α
MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos -1
IL: Interleucina
ROS: Espécies reativas de oxigênio
DAC: Doença arterial coronariana
FDA: Food and Drug administration
HMG-CoA: Hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A
LFA-1: Antígeno-1 da função de linfócitos
KCl: Cloreto de potássio
KOH: Hidróxido de potássio
ALT: Alanina aminotransferase
AST: Aspartato aminotransferase
TG: Triglicerídeos
Col: Colesterol
BSA: Albumina sérica bovina
LPS: Lipopolissacarídeos
CLP: Ligadura e punção do ceco
NO: Óxido nítrico
SOD: Superóxido dismutase.
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotideo reduzida
Cat: Catalase
GST: Glutathione-S-Transferase
GSH: Glutathione reduzida
LPO: Taxa de peroxidação lipídica
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio.
O₂⁻: Ânion superóxido.
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
HEPES: Hidroxietyl piperazina ácido etanesulfônico.
EGTA: Ácido tetra acético etilenoglicol
MN: Mononucleares
PMN: Polimorfonucleares
cDNA: DNA complementar
SEM: Erro padrão da média
ANOVA: Análise de variância

Sumário

Resumo	8
Abstract.....	9
Lista de figuras	10
Lista de tabelas.....	11
Lista se abreviaturas.....	12
1. Revisão da literatura	14
1.1. Epidemiologia da sepse	14
1.2. Fisiopatologia da sepse	15
1.3. Via oxidativa mitocondrial e Estresse oxidativo.....	16
1.4. Disfunções hepáticas na sepse.....	18
1.5. Tratamentos disponíveis para a sepse	19
1.6. Estatinas	20
1.7. Modelo CLP de sepse: Ligadura e Punção do Ceco.....	23
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. Artigo científico	25
4. Considerações Finais	53
5. Referências Adicionais	54

1. Revisão da literatura

1.1. Epidemiologia da sepse

A sepse é uma síndrome complexa e heterogênea, definida como uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) decorrente de infecção (ABRAHAM *et al*, 2000). Nesta situação ocorre inabilidade do sistema imune em controlar a disseminação de microrganismos patogênicos durante a infecção e uma complexa cascata de eventos é iniciada após a invasão dos mesmos (MEDZHITOV AND JANEWAY, 2000). Os locais mais freqüentes de infecção são os pulmões, o trato urinário e a cavidade abdominal. Originalmente considerava-se que as bactérias Gram-negativas seriam os principais agentes causais, mas atualmente as bactérias Gram-positivas assumem a mesma importância. Em seguida citam-se as infecções fúngicas e, por fim, as causas parasitárias (ASTIZ *et al*, 1998).

Para afirmar o estabelecimento da sepse ou da SIRS, pelo menos dois dos seguintes critérios clínicos devem estar presentes: hipotermia ou hipertermia, com temperatura corporal inferior a 36°C ou superior a 38°C, respectivamente; taquicardia (mais que 90 batimentos por minuto); taquipnéia (mais que 20 movimentos respiratórios por minuto ou P_aCO_2 menor que 32 mmHg); leucocitose ou leucopenia, com contagem de leucócitos superior a 12000 células/ mm³ ou inferior a 4000 células/ mm³ ou, ainda, presença de mais de 10% de formas celulares imaturas (BONE *et al*, 1992).

A prevenção da sepse vem ganhando grande importância nos últimos anos, devido ao aumento em sua incidência e às elevadas taxas de mortalidade. Trata-se da principal causa de morte nas unidades de terapias intensivas (UTIs) não coronarianas (ANGUS *et al*, 2001). Apesar das constantes melhorias conseguidas no tratamento do paciente séptico, como o uso de antibióticos, intervenções cirúrgicas e monitoramento intensivo, essa realidade permanece (JONES *et al*, 2008). A taxa de mortalidade na sepse severa varia de 30 a 50%, aumentando para 80 a 90% quando ocorre o choque séptico e a falência múltipla de órgãos (SCHLICHTING & MCCOLLAM, 2007).

Entre as razões para o aumento na incidência de sepse pode-se citar o aumento da expectativa de vida (a síndrome é mais freqüente e mais letal em pacientes idosos), aumento no número de pacientes imunocomprometidos, uso

freqüente de antibióticos (levando ao aumento da resistência bacteriana) e aumento da freqüência de procedimentos invasivos (MARTIN *et al*, 2003; RANGEL-FRAUSTO, 2005). Hipóteses mais recentes levam a crer que a mortalidade é decorrente da resposta do hospedeiro e não somente da ação do patógeno por si (BONE *et al*, 1997). Além da mortalidade *per se*, existe preocupação com a questão econômica. Estima-se que nos Estados Unidos da América, o custo anual dispensando para o tratamento da sepse ultrapassa 16 bilhões de dólares (ANGUS *et al*, 2001).

No Brasil, a realidade da sepse é muito semelhante. SALES JÚNIOR *et al* (2006) realizaram um estudo epidemiológico sobre o tema, no qual foram investigadas 75 UTIs distribuídas pelo país. A incidência dos casos de sepse foi de 16%. Dentre estes pacientes, a taxa de mortalidade média foi de 46,6%, sendo de aproximadamente 16% para sepse, 34% para a sepse grave (sepse associada à hipotensão, hipoperfusão ou disfunção de órgãos) e 65% para o choque séptico (sepse associada à hipotensão não responsiva à fluidoterapia e insuficiência múltipla de órgãos). A média de idade desses pacientes foi de 61 anos. As infecções prevalentes eram de origem pulmonar (69%) e abdominal (21%). Quanto ao agente infeccioso, 40,1% eram bacilos Gram-negativos, 32,8% cocos Gram-positivos e 5% fungos. ZANON *et al* (2008) encontraram uma incidência ainda maior: 58% dos pacientes admitidos nas UTIs avaliadas desenvolveram SIRS, e destes casos, 71% foram atribuídos a causas infecciosas.

1.2. Fisiopatologia da sepse

O processo inflamatório na sepse se inicia no foco da infecção, onde os microrganismos se proliferam, liberam diversos componentes, como lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e exotoxinas, ou invadem a circulação sistêmica (KARIMA *et al*, 1999). A interação destes componentes com as células do hospedeiro, como macrófagos e monócitos, induzem a liberação de mediadores inflamatórios, que desempenham um importante papel na patogênese do choque séptico (BONE, 1996). A produção excessiva destes mediadores, incluindo citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IL-6, IL-8 e MCP-1 desencadeiam o dano tecidual que precede a insuficiência múltipla de órgãos (BOZZA *et al*, 2007). Ao mesmo tempo, e talvez como um mecanismo compensatório, diversos

mediadores antiinflamatórios são liberados, como por exemplo, IL1-RA, IL-10 e IL-4. Enquanto o excesso de mediadores inflamatórios leva à inflamação descontrolada, uma liberação excessiva de mediadores antiinflamatórios pode levar à anergia e imunossupressão (RITTIRSCH *et al*, 2007).

Dentre as conseqüências da liberação de mediadores inflamatórios estão as alterações hemodinâmicas, que resumidamente incluem vasodilatação, extravasamento capilar e redução da contratilidade do miocárdio, (MACKENZIE & LEVER, 2007) e também alterações na coagulação sanguínea (RITTIRSCH *et al*, 2007). Durante a sepse ocorre um desequilíbrio entre o consumo e a disponibilidade de oxigênio, que pode levar à hipóxia tecidual. Na tentativa de priorizar a disponibilidade de oxigênio para as áreas mais cruciais, como cérebro e miocárdio, ocorrem alterações na microcirculação e o fluxo sanguíneo em outras áreas é prejudicado. Quando essa situação não é revertida a tempo, importantes alterações celulares e, principalmente mitocondriais, ocorrem, desenvolvendo-se a falência múltipla de órgãos (VINCENT, 2001).

1.3. Via oxidativa mitocondrial e Estresse oxidativo

As mitocôndrias possuem uma extensa área de superfície devido às membranas internas. Estas membranas contêm as enzimas responsáveis pela produção de energia a partir do oxigênio. A transferência de elétrons na cadeia transportadora resulta em uma recíproca transferência de prótons, criando o potencial de membrana mitocondrial. Em parte deste processo, espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas como produtos da redução incompleta do oxigênio. Cerca de 1% do oxigênio utilizado é convertido em ROS (GALLEY, 2011).

As mitocôndrias são as principais geradoras e também o principal alvo das ROS (MURPHY, 2009). Em situações normais, o sistema antioxidante é capaz de neutralizar a formação de ROS pela mitocôndria. No entanto, o estresse oxidativo é o desequilíbrio entre componentes pró-oxidantes e antioxidantes, com o aumento de pró-oxidantes ou redução de antioxidantes. Assim, durante a insuficiência múltipla de órgãos induzida pela sepse, o processo inflamatório e o estresse oxidativo subsequente induzem disfunção mitocondrial, que resultam em morte celular (GALLEY, 2011). Existe atualmente um considerável conjunto de evidências

sugerindo que o estresse oxidativo desempenha um importante papel em diversos aspectos do choque séptico. Estudos bioquímicos e imunohistoquímicos demonstraram o papel das ROS durante a sepse. (SALVEMINI & CUZZOCREA, 2002; CRIMI *et al*, 2006), bem como existem evidências substanciais que suportam a idéia de que a falência múltipla de órgãos decorrente da sepse resulta da utilização inadequada do oxigênio celular (APOSTOLOVA *et al*, 2011).

O termo ROS inclui moléculas com elétrons não pareados, chamados de radicais livres, como o ânion superóxido ($O_2\bullet$) e também agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As ROS podem reagir avidamente com moléculas próximas de maneira indiscriminada e podem causar danos se não controladas (GALLEY, 2011). Às vezes, os radicais livres podem iniciar uma reação em cadeia. É o que acontece na peroxidação lipídica. O radical peroxil, quando formado, remove um átomo de hidrogênio dos ácidos poliinsaturados próximos para continuar o processo, convertendo-se em um peroxilípídeo. O resultado da extensa peroxidação lipídica é a morte celular. Ainda, outras estruturas celulares também são danificadas pelas ROS, incluindo o DNA (SALVEMINI & CUZZOCREA, 2002). Durante o choque séptico, os leucócitos liberam mediadores inflamatórios, e dentre eles as ROS. Uma maior liberação de ROS está relacionada a maiores taxas de mortalidade (LEAVER *et al*, 1995). DURANT *et al*, (2004) demonstraram que o tratamento com substâncias antioxidantes leva à redução na mortalidade durante a sepse. Assim, antioxidantes mitocondriais são apontados como alvos terapêuticos para o tratamento da sepse (APOSTOLOVA *et al*, 2011).

A fisiopatogenia da sepse e a participação de mediadores inflamatórios e do estresse oxidativo estão demonstrados, de modo esquematizado, na figura 1.

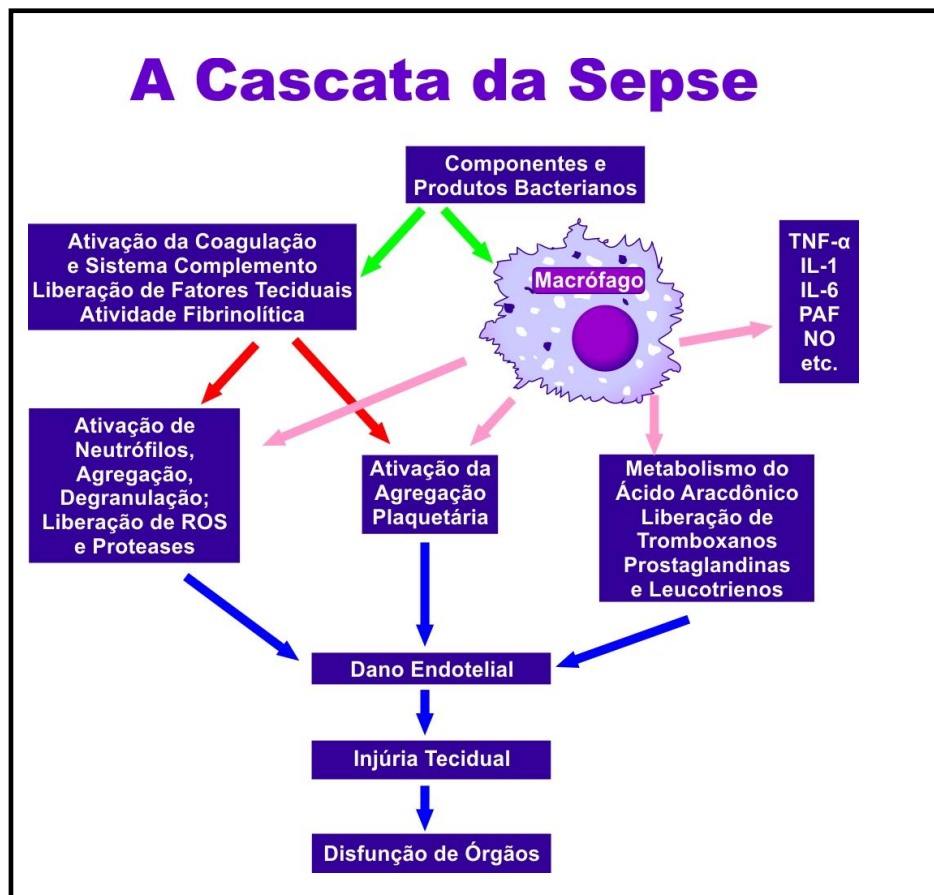


Figura 1: Eventos e mediadores envolvidos na fisiopatogenia e progressão da sepsis. Adaptado de www.medscape.com.

1.4. Disfunções hepáticas na sepsis

O fígado é o segundo órgão mais afetado na sepsis, sendo os pulmões os primeiros (BEAL *et al*, 1994). Os hepatócitos possuem receptores para os mediadores inflamatórios e, durante a sepsis, modificam vias metabólicas para a captação de aminoácidos, ureagênese, e gluconeogênese, para priorizar a síntese protéica e garantir o reparo celular (DHAINAUT *et al*, 2001).

As células de Kupffer fazem o *clearance* de bactérias, citocinas e endotoxinas (KATZ *et al* 1991). Elas representam a maior população orgânica de macrófagos, compreendendo de 80 a 90% das reservas teciduais, e secretam mediadores inflamatórios que produzem efeitos sistêmicos. Por exemplo, secretam a IL-6, que participa significativamente da cascata de eventos que aumentam a susceptibilidade do hospedeiro à sepsis (HILDEBRAND *et al*, 2006). Por outro lado, KONO *et al* (2006) demonstraram que a eliminação das células de Kupffer leva ao aumento da mortalidade na sepsis e que isto se deve provavelmente ao fato de estas células produzirem IL-10, que é uma citocina com atividade antiinflamatória.

As disfunções hepáticas decorrentes da sepse podem ser classificadas em primárias ou secundárias. A disfunção primária refere-se àquela imediatamente após um episódio de choque e ressuscitação. Ocorre redução do *clearance* de lactato e aminoácidos, da síntese de proteínas e da gliconeogênese e glicogenólise. O extravasamento de transaminases é característico desta injúria e reflete lesão aguda celular e/ou mitocondrial. A perfusão deficiente parece ser a principal causa da disfunção primária, enquanto a disfunção hepática secundária decorre da presença de bactérias, endotoxinas e mediadores inflamatórios. Inflamações localizadas, como a liberação de eicosanóides, óxido nítrico (NO), endotelinas e outros mediadores inflamatórios induzem à ativação da coagulação e sistema complemento. (DHAINAUT *et al*, 2001).

1.5. Tratamentos disponíveis para a sepse

Devido à preocupação com os altos índices de mortalidade da sepse, decorrentes de sua complexa patogenia, no ano de 2002 diversas sociedades científicas internacionais se reuniram e criaram a “*Surviving Sepsis Campaign - Clinical Management Guidelines*”. Essa campanha foi revisada posteriormente em 2004 e 2008 e preconiza as medidas que devem ser tomadas no diagnóstico e tratamento desta síndrome. Essas medidas foram divididas em categorias como “sugerido” e “fortemente recomendado” e incluem: identificação da causa, antibioticoterapia, fluidoterapia, administração de vasopressores, terapia inotrópica, administração de proteína C ativada, administração de produtos sanguíneos (eritócitos e plaquetas), ventilação mecânica, sedação, analgesia, bloqueio neuromuscular e controle glicêmico (DELLINGER *et al*, 2008).

Porém, apesar dos inúmeros esforços realizados, a alta mortalidade da sepse segue sendo um desafio. Essa realidade faz com que diversas novas terapias sejam estudadas, entre elas: inibidores da farnesiltransferase (SHINOZAKI *et al*, 2010), pioglitazona (HARAGUCHI *et al*, 2008), *Aloe vera* (YUN *et al*, 2009), terbutalina (TSAO *et al* 2010), resolvina D2 (SPITE *et al*, 2009), glutamina (OLIVEIRA *et al*, 2009), albumina (DELANEY *et al*, 2011) e estatinas (MERX *et al*, 2005; YASUDA *et al*, 2006; MCGOWN & BROOKS, 2007).

1.6. Estatinas

As estatinas são originárias de cultura de fungos, sendo a primeira substância dessa família isolada em 1971 de uma cultura de *Penicillium sp.* Esta se revelou excelente inibidora da síntese de colesterol, mas, por sua toxicidade, não reunia condições de uso clínico. Posteriormente, foi isolada a lovastatina da cultura de *Aspergillus terreus*, com igual propriedade da substância anterior, mas com mínima toxicidade. Desde então foram produzidas várias outras substâncias, inclusive sintéticas, com fórmulas estruturais semelhantes, todas mostrando efeito inibidor na síntese do colesterol (ENDO *et al*, 1992; GIANNINI *et al*, 1999).

As estatinas são utilizadas essencialmente para tratamento das hiperlipidemias, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de doença arterial coronariana (DAC) (CAMPO E CARVALHO, 2007). Desde que foram aprovadas pelo FDA em 1987, diversos estudos clínicos têm demonstrado bons resultados na prevenção primária ou secundária da DAC (SHEPHERD *et al*, 1995).

A via de síntese do colesterol é composta por várias reações, agrupadas em quatro etapas principais. Na primeira etapa, três moléculas de acetato condensam-se, produzindo hidróxi-3-metil-glutaril-Coenzima A (HMG-CoA), que é reduzido a mevalonato, em reação catalisada pela hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase). A ação desta enzima é o principal ponto de regulação da via (FONSECA, 2005; LEHNINGER *et al*, 2006), portanto os efeitos hipocolesterolêmicos das estatinas são resultantes de sua atividade inibidora sobre a enzima HMG-CoA redutase. Estes medicamentos são capazes de mimetizar o substrato natural HMG-CoA, bloqueando a sua conversão em ácido mevalônico, e assim inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol (FONSECA, 2005; CAMPO E CARVALHO, 2007).

Além do efeito hipocolesterolêmico das estatinas, outros importantes efeitos podem ser destacados, como:

a) Efeitos antiinflamatórios

A redução do mevalonato mediada pelas estatinas também reduz a síntese do colesterol via isoprenóides, bem como a função de várias moléculas sinalizadoras intracelulares também é afetada. *In vitro*, as estatinas reduzem a produção de

citocinas e a expressão de moléculas de adesão endotelial. As estatinas se ligam a um sítio alostérico na integrina $\beta 2$ conhecido como LFA-1, que participa de muitos processos inflamatórios. Essa ligação ao Antígeno-1 da função de leucócitos LFA-1 é independente da inibição da HMG-CoA redutase (KUIJK *et al*, 2008). Em modelos animais, há dados consistentes dos efeitos antiinflamatórios das estatinas e em muitos estudos mostraram redução da severidade de doenças como colites, uveítes, miocardites e asma (ABELES & PILLINGER, 2006).

b) Efeitos antioxidantes

Devido aos efeitos deletérios em macromoléculas, as ROS induzem alterações celulares que podem levar a várias doenças (GATÉ *et al*, 1999). Estudos sugerem que as estatinas possuem ações antioxidantes, combatendo as ROS (SALVEMINI & CUZZOCREA, 2002; AJITH *et al*, 2008). Evidências recentes demonstraram que esse efeito é responsável, pelo menos em parte, pela ação antiarteroesclerótica das estatinas, através da inibição da oxidação do LDL (SEZER *et al*, 2011). Ainda, o uso concomitante da pravastatina com primaquina é capaz de inibir o efeito indesejado desta droga, um anti-malárico que induz como efeito colateral dano aos eritrócitos através da produção de radicais livres (ALANAZI, 2010). DURANT *et al* (2004) demonstraram que a produção do ânion superóxido está aumentada durante a sepse e que a simvastatina promove a redução da produção *ex-vivo* do ânion superóxido em 40%. Por outro lado, TROCHA *et al* (2010) avaliaram o efeito antioxidante da simvastatina em um modelo de isquemia e reperfusão e não encontraram efeitos benéficos. Isso também aconteceu quando o mesmo efeito foi avaliado por ZAMIN *et al* (2010) em um modelo de esteatose hepática não-alcoólica. Assim como KUKLIŃSKA *et al* (2010) demonstraram que o efeito hipotensivo da atorvastatina não está relacionado com proteção antioxidante.

c) Efeitos hepáticos

Os efeitos de estatinas sobre o fígado são controversos na literatura. Há alguns relatos de hepatotoxicidade com o uso de simvastatina (RUSSO *et al*, 2009). A administração de 125 mg/kg ao dia de simvastatina provocou hepatotoxicidade, provavelmente pela inibição da HMG-CoA redutase e síntese do mevalonato, pois a via do mevalonato é importante para a produção de proteínas de membrana celular e biossíntese de esteróides (HORSMANS *et al*, 1990). Em ensaios clínicos o uso de

estatinas está associado a aumentos de aminotransferases séricas a níveis três vezes maiores que o limite superior, em cerca de 0,1 a 2,7% dos pacientes (CHALASANI, 2005) Experimentalmente, a combinação de simvastatina com ezetimibe provocou aumento no tamanho do fígado e significativas alterações do metabolismo de glicose e captação de oxigênio em hepatócitos (BRACHT *et al*, 2011).

Por outro lado, SLOTTA *et al* (2010) demonstraram que o pré-tratamento com simvastatina preveniu o aumento da ALT, a infiltração de leucócitos, a apoptose de hepatócitos e os níveis de TNF α em animais hepatectomizados e desafiados com LPS. Portanto, os efeitos hepáticos das estatinas ainda não são consenso na literatura científica publicada, e parecem depender da condição patológica envolvida.

d) Efeitos das estatinas em sepse

Na literatura científica, há diversos relatos de redução de mortalidade e morbidade na sepse proporcionada pelo tratamento com estatinas (MERX *et al*, 2005; YASUDA *et al*, 2006; MCGOWN & BROOKS, 2007). MCGOWN *et al* (2010) relataram benefícios relacionados à redução da hipotensão e ação antiinflamatória do tratamento com a pravastatina em ratos desafiados com LPS. O'NEAL *et al*, (2011) realizaram um estudo prospectivo e concluíram que pacientes que fizeram uso de estatinas antes da hospitalização tiveram menor risco de sepse. Esse efeito foi potencializado em pacientes que faziam uso do ácido acetil-salicílico. ARAÚJO-FILHO *et al* (2010) relataram redução de mortalidade na sepse em ratos diabéticos tratados com simvastatina. Alguns artigos relacionam ação benéfica de estatinas com redução da produção de TNF α , interleucinas e/ou NO (ANDO *et al*, 2000; YASUDA *et al*, 2006; SOUZA *et al*, 2006; CHEN *et al*, 2007).

Entretanto, não há consenso a respeito desse efeito protetor. Alguns autores chamam atenção para a necessidade de estudos randomizados (FALAGAS *et al*, 2008; NOVACK *et al* 2006). Existem também estudos que demonstram efeitos adversos das estatinas em sepse (MCGUIGAN *et al*, 2011). Além disso, a maior parte dos estudos publicados avalia a administração única ou aguda frente a modelos de sepse (ANDO *et al*, 2000; MATSUDA *et al*, 2006; SLOTTA *et al* 2010), havendo carência de dados com tratamentos prolongados.

Com relação às doses utilizadas em trabalhos envolvendo estatinas e sepse, há uma grande variação. Para a simvastatina, por exemplo, as doses variam de 0,02

mg/kg (SLOTTA *et al*, 2010) até 40 mg/kg (YASUDA *et al*, 2006). Em virtude disso, para a realização deste trabalho partimos da dose de bula mais recomendada para o tratamento da hipercolesterolemia em seres humanos (10 mg/dia/indivíduo para atorvastatina e 20 mg/dia/indivíduo para a simvastatina). Em seguida realizamos a extrapolação alométrica destas doses para a espécie que adotamos como modelo (*Rattus norvegicus*).

1.7. Modelo CLP de sepse: Ligadura e Punção do Ceco

O modelo da CLP é o mais amplamente utilizado para fins experimentais e atualmente é considerado o “padrão ouro” em pesquisas com sepse. O curso da sepse decorrente da CLP é o que mais se assemelha com o que ocorre em pacientes sépticos (RITTIRSCH *et al*, 2007).

O modelo consiste em realizar uma ligadura próxima à valva ileocecal e, em seguida, perfurações do órgão com uma agulha. Estas perfurações levam a uma peritonite polimicrobiana, seguida de translocação de bactérias ao sangue. Em roedores, a CLP mimetiza características clínicas da sepse como hipotermia, taquipnéia, taquicardia e hipotensão. Desencadeia-se uma resposta inflamatória que leva à instabilidade hemodinâmica, choque séptico, falência múltipla de órgãos e óbito (ZANOTTI-CAVAZONE & GOLDFARB, 2009).

Semelhante ao que ocorre na sepse humana, o desenvolvimento da sepse desencadeada pelo modelo CLP ocorre em duas fases. Uma fase inicial ou hiperdinâmica, caracterizada por aumento do débito cardíaco e perfusão tecidual e redução da resistência vascular, seguida por uma fase tardia ou hipodinâmica, em que ocorre redução do débito cardíaco, redução da perfusão tecidual e aumento da resistência vascular (YANG *et al*, 1999).

A CLP foi o modelo de estudo utilizado neste trabalho, que avaliou o efeito de duas estatinas, simvastatina e atorvastatina, administradas por 30 dias previamente à indução da sepse. Tal protocolo pretendeu preencher a lacuna acerca dos efeitos de tratamentos prolongados de estatinas em condições sépticas, como previamente comentado.

2. Objetivos

2.1. *Objetivo Geral*

O objetivo principal deste trabalho foi investigar os efeitos em longo prazo das estatinas em sepse, enfatizando suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e metabólicas. Este objetivo decorre do fato de não haver unanimidade na literatura sobre os benefícios das estatinas nessa condição clínica, bem como pela carência de dados sobre o efeito do tratamento prolongado com estas drogas em sepse.

Como representantes dessa classe foram escolhidas duas estatinas, a simvastatina, mais antiga, de origem fúngica e amplamente utilizada, e a atorvastatina, mais moderna e de origem sintética.

2.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar se as estatinas promovem redução de danos hepatocelulares frente ao desafio da CLP, analisados através de bioquímica sérica e histologia hepática.
- Investigar o efeito protetor das estatinas por redução do estresse oxidativo hepático, analisado através de dosagens de enzimas hepáticas (catalase, superóxido-dismutase e glutathione S-transferase), mensuração da taxa de peroxidação lipídica, quantificação do peptídeo antioxidante glutathione, expressão gênica de *SOD* e registro polarográfico da atividade enzimática mitocondrial.
- Avaliar os efeitos antiinflamatórios das estatinas através da contagem de leucócitos no sangue e peritônio, bem como pela quantificação do TNF α (nível plasmático e expressão gênica hepática).

3. Artigo científico

STATINS FAILED TO PREVENT LIVER DAMAGES INDUCED BY POLYMICROBIAL SEPSIS IN RATS

Aline Maria Stolf¹, Francislaine dos Reis Lívero¹, Arturo Alejandro Dreifuss¹,
Amanda Leite Bastos-Pereira¹, Isabella Aviles Fabosi¹, Carlos Eduardo Alves de
Souza¹, Liana de Oliveira Gomes¹, Raphaella Chicorski¹, Anna Paula Brandt², Silvia
Maria Suter Cadena², José Ederaldo Queiroz Telles³, Aline Borsato Hauser⁴, Ronald
Oude Elferink⁵, Aleksander Roberto Zampronio¹, Alexandra Acco¹ *

¹ Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

³ Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

⁴ Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

⁵ Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

*** Corresponding author:**

Alexandra Acco, Federal University of Paraná (UFPR), Biological Science Sector,
Department of Pharmacology, Centro Politécnico, Cx. P. 19031, Curitiba – Paraná –
Brazil, Zip Code 81530-980

Phone: +55 (41) 3361-1743; Fax: +55 (41) 3266-2042

E-mail: alexandra.acco@gmail.com

Financial support: REUNI / CAPES

Background: Several data suggest that treatment with statins during sepsis may be helpful, but there is no convincing data in the literature. The aim of this study was to investigate the hepatic effects of long-term statins treatment in sepsis, focusing on its antioxidant, anti-inflammatory and metabolic properties.

Experimental approach: Male wistar rats were treated orally with simvastatin, atorvastatin or vehicle once a day. After 30 days, sepsis was induced by CLP on Control, Simvastatin- and Atorvastatin-treated groups. Sham group, was submitted to laparotomy. Basal Simvastatin and Basal Atorvastatin groups received those drugs respectively, but were not submitted to any surgical procedure. Twenty-four hours after CLP or laparotomy, animals were anaesthetized for sample collection. Assays were performed to evaluate hepatic oxidative stress, liver histology, activity of hepatic mitochondria enzymes, leukocyte counting on blood and peritoneum, gene expression of hepatic superoxide dismutase and TNF-2, plasmatic biochemistry and plasmatic TNF – α .

Results: Most of the parameters tested showed alterations compatible with sepsis outcome. However, only mitochondrial enzymatic activity presented improvement of statins treatment in rat livers. In other parameters, simvastatin and atorvastatin failed to protect the liver against injuries of CLP polimicrobial sepsis model.

Conclusions: The treatment with simvastatin and atorvastatin as single drug before inducing CLP seems to improve the mitochondrial activity, but this result was not reproducible in other biomarkers of liver function and leukocytes migration during sepsis. Future studies should be encouraged to evaluate the combination of statins with other drugs used in the therapy of sepsis.

Key words: sepsis, liver, simvastatin, atorvastatin, oxidative stress, leukocytes, mitochondria.

1. Introduction

Sepsis is a syndrome caused by the invasion of organism by infectious agents, establishing a serious endotoxemia condition. It is characterized by generalized inflammation with overproduction of cytokines and disturbance in circulatory system (1). Moreover, it is known that the oxidative stress plays an important role in pathogenesis of sepsis (2). The second organ more affected in sepsis is the liver, while the lungs are the first ones (3). During sepsis, several hepatic metabolic alterations occur. These alterations may have an important role in the outcome of the disease since the liver plays host defense mechanisms and inactivates and clears bacteria and bacterial products through Kupffer cells. In addition, liver Kupffer cells are also responsible for the production and clearance of inflammatory mediators during sepsis. On the other hand, metabolic pathways in hepatocytes can be affected by inflammatory cytokines (4).

Statins, represented by simvastatin and atorvastatin, are hypocholesterolemic drugs that have been demonstrated to possess pleiotropic effects, either dependent or independent of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase) inhibition. Those effects include antioxidant (5) and anti-inflammatory properties. The last one has been related with reductions in morbidity and mortality associated with sepsis condition (6; 7). However, this protective action is not consensus in the literature. Some studies called attention for the lack of randomized control trials (8). There are also studies demonstrating adverse effects of statins in sepsis (9). Additionally studies evaluating the effect of long-term use of statins in sepsis are still missing since most of them focused on acute or single administration effects (10; 11). It is also important to evaluate the safety of statins in sepsis during a long-term treatment. Although statins are considered safe drugs, there are reports

of cases of hepatotoxicity (12). In this article simvastatin and atorvastatin were tested: the first one due to its widespread use and the second one to provide a comparison with a recently developed and probably more efficacious statin.

Since sepsis remains the first cause of mortality and morbidity in non-coronary intensive care units (13) and that the positive effects of statins are not yet clear, studies on different statins and other agents for the sepsis treatment remain necessary. Therefore, the major objective of this study was to investigate the hepatic effects of long-term statins treatment in experimental sepsis focusing on its antioxidant, anti-inflammatory and changes in metabolic parameters.

2. Materials and methods

2.1 *Animals.* All the experimental protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Use (CEUA) of Biological Sciences Section of Federal University of Paraná (certificate # 475). Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), with 200-250 g of body weight, housed at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and maintained in a 12 h dark-light cycle, were utilized in the experiments. The animals had free access to water and standard laboratory chow during the treatment.

2.2 *Animal treatments.* Rats were treated via oral gavage once a day, during 30 consecutive days. The animals were separated in eight different groups. Sham group (n=6) and Control group (n=6) received vehicle of (polysorbate 80 and distilled water) (30 μL of vehicle/ mL of water). Simvastatin 1 (Galena®, Campinas, SP, Brazil) (n=6) and Atorvastatina 1 (Pharma Nostra®, Anápolis, GO, Brazil) (n=6) groups received 1.17 mg/kg and 0.59 mg/kg of these drugs respectively. These doses were obtained by allometric extrapolation (14) of doses indicated for the

treatment of hypercholesterolemia in humans. Simvastatin 2 (n=6) and Atorvastatin 2 (n=6) groups received doses 5-fold higher than the formers, respectively 5.85 mg/kg and 2.95 mg/kg. Basal Simvastatin and Basal Atorvastatin groups also received 5.85 mg/kg and 2.95 mg/kg respectively (n=5), but these animals were not submitted to any surgical procedure to induce sepsis.

2.3 *Procedure to induce sepsis by cecal ligation and puncture (CLP).*

Briefly, the animals were anesthetized intraperitoneally with ketamine hydrochloride (100 mg/kg) and xilazine hydrochloride (10 mg/kg). Sepsis was induced in groups control, Simvastatin 1 and 2, and Atorvastatin 1 and 2. Three punctures were made with a 16-gauge needle and the cecum was squeezed to extrude the fecal material from the wounds. This technique developed sepsis with approximately 50% of survival index in seven days, allowing collection of viable material to evaluate biomarkers of sepsis. This protocol was chosen based in previous studies in which different numbers of punctures were tested (data now shown). Few hours after CLP, the animals developed hypothermia, evidenced abdominal contraction, prostration, spiked hair and lethargy. The Sham group was submitted only to laparotomy and the animals did not present clinical signs of infection or pain. Both Simvastatin and Atorvastatin Basal groups were not submitted to any surgical procedures. Operated animals received sterile saline subcutaneously (10 mL/kg) immediately after the end of the skin suture, for fluid resuscitation. After 12 h of CLP or laparotomy, the rats were fasted for additional 12 h to avoid variations in plasma biochemical parameters.

2.4 *Sample collection.* Twenty-four hours after the surgical procedures animals were anesthetized as described previously (item 2.3). Blood was drawn from abdominal cava vein with heparinized syringes. Plasma was separated by centrifugation and stored at -70°C for further analysis. Liver was rapidly harvested, frozen in liquid nitrogen and also stored at -70°C. Another liver section (major lobe) was stored in 4% buffered formalin for histological analysis. After sample collection, euthanasia of the animals was performed under deeper anesthesia.

2.5 *Hepatic oxidative stress.* Biomarkers of redox status in hepatocytes were evaluated. For that, liver samples were homogenized in phosphate-buffered solution (pH 6.5) and centrifuged at 10000g and 4°C for 20 minutes. The supernatant was used for measurement of enzyme activities, namely catalase (Cat) (15), superoxide-dismutase (SOD) (16) and glutathione-S-transferase (GST) (17). In addition, the rate of lipid peroxidation (LPO) (18) and reduced glutathione (GSH) (19) were measured. Those results were expressed in relation to the amount of protein in each liver homogenate. Protein concentration was determined by the Bradford method (20).

2.6 *Hepatic histology.* Liver tissue sections were fixed in ethanol at room temperature. After fixed, samples were dehydrated in a graded series of ethanol before paraffin embedding. Thereafter, thin sections (4 μm) were processed for histology and tissue stained with hematoxylin and eosin. Later on, the slides were analyzed by optic microscopy.

2.7 *Plasma biochemistry.* Plasmatic concentrations of cholesterol (CHO) and triglycerides (TG), and activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were analyzed in an automated system, according to the kit manufacturer's instructions (Labtest Diagnóstica™, Lagoa Santa, MG, Brazil).

2.8 *Mitochondrial enzymatic activity.* Mitochondrial fraction was obtained from frozen rat liver by differential centrifugation as described by Voss *et al.* (21), using an extraction medium consisting of 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES-KOH (hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid - potassium hydroxide) pH 7.2, 1 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), and 0.1 g% BSA (bovine serum albumin). Protein concentrations were determined according to Lowry *et al.* (22). Disrupted mitochondria obtained by a freeze-thawing treatment were used to determine polarographically the activity of NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) oxidase and succinate oxidase according to Singer (23), with modifications. Briefly, oxygen uptake in mitochondrial fraction was monitored by high resolution respirometry (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) in a medium containing manitol 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0,1 mM e BSA 0,05 g% pH 7.4, supplemented either with 1 μ M rotenone, 10 mM sodium succinate and 1 mg of mitochondrial protein or with 0.2 mM NADH and 2 mg of mitochondrial protein. The measurements were made in two chamber (2 mL each one) at 37°C under agitation. It was considered the oxygen solubility factor of 0.92 for medium and at local barometric pressure (91kPa), the concentration of oxygen at air saturation was 172.42 μ M (24). The results are expressed as oxygen flow per mg protein [pmols/(s*mg protein)] as media \pm standard error of the mean (SEM). From

treated rats, these experiments were performed only in those that received the highest dose of statins (Simvastatin 2 and Atorvastatin 2).

2.9 *Blood leukocyte counting and leukocyte migration.* Rats were treated and submitted to sepsis induction as described previously. Twenty-four hours after the CLP or laparotomy, animals were anesthetized using the same protocol described in item 2.3, but the injection was intramuscular to avoid occurrence of bleeding in peritoneal cavity. Each animal was injected intraperitoneally with 10 mL of PBS cold solution containing heparin (5 U/ml) and albumin (0.03% w/v). After a quick massage in the abdominal region, the peritoneal exsudate was collected. Under the same anesthesia, the peritoneal cavity was exposed and blood was collected from the abdominal cava vein as described earlier. Blood and exsudate were diluted in Turk solution and total leukocyte counts were performed under light microscopy using a Neubauer's chamber. Additionally, slides were prepared and stained with May-Grunwald-Giemsa for leukocyte mononuclear (MN) and polymorphonuclear (PMN) counting. Results are reported as the number of cells per mL of blood or peritoneal fluid.

2.10 *Hepatic gene expression.* Aiming to evaluate the expression of genes related with inflammatory response and hepatic oxidative stress, mRNA level of *SOD* and *TNF* (Tumor necrosis factor) were measured in real time (RT) PCR. From 2,0 µg RNA, the complementary DNA (cDNA) was synthesized following all the steps of reaction in specific program for PCR-thermocycler (light Cycler® 480 System, Roche). The quality of cDNA synthesized was evaluated by the quantification of the housekeeping gene β -actin. The expression of those genes of

interest were shown subsequently as relative expression. All primers were purchased by Interprise™ company, which sequences are: *TNF-2*: CATTCTGCTCGTGGCGGGG and GCTGCTCCTCCGCTTGGTGG; *SOD-1*: AAGGCCGTGTGCGTGCTGAA and TCATCCGCTGGACCGCCATG.

2.11 *Plasmatic level of TNF α* . This cytokine was measured by Elisa method at 450 nm, following the instructions of the kit Ready-SET-Go!® Rat TNF-alpha from eBioscience (San Diego, California, USA).

2.12 *Statistical analysis*. The results were expressed as mean \pm SEM and were statistically analyzed by one-way ANOVA and Newman-Keuls as post-hoc test ($p < 0.05$). The program GraphPad Prism™ 5.0 was used for both statistical analysis and figures design. Histological analysis was performed by qualitative observations.

3. Results

3.1 *Alterations in plasma biochemistry parameters after statins long-term treatment and polymicrobial sepsis*. Activity of AST was higher in Control group compared with Sham and Basal groups, clearly showing differences between septic and non-septic groups 24 h after CLP. No improvement was noted in Simvastatin 1 and 2 or Atorvastatin 1 and 2 groups. Similar result was observed for the plasmatic concentrations of TG, however rats treated with higher doses of statins did not differ from Sham or Control groups in this parameter (Figure 1). Sham rats were not different from Basal groups in both parameters, but statins Basal groups presented reduce AST and TG values compared to septic groups. These results evidenced that the increased plasmatic levels of AST and TG in septic groups is related to

sepsis and not with statin treatment. No difference among groups were observed in CHO and ALT assays (data not shown).

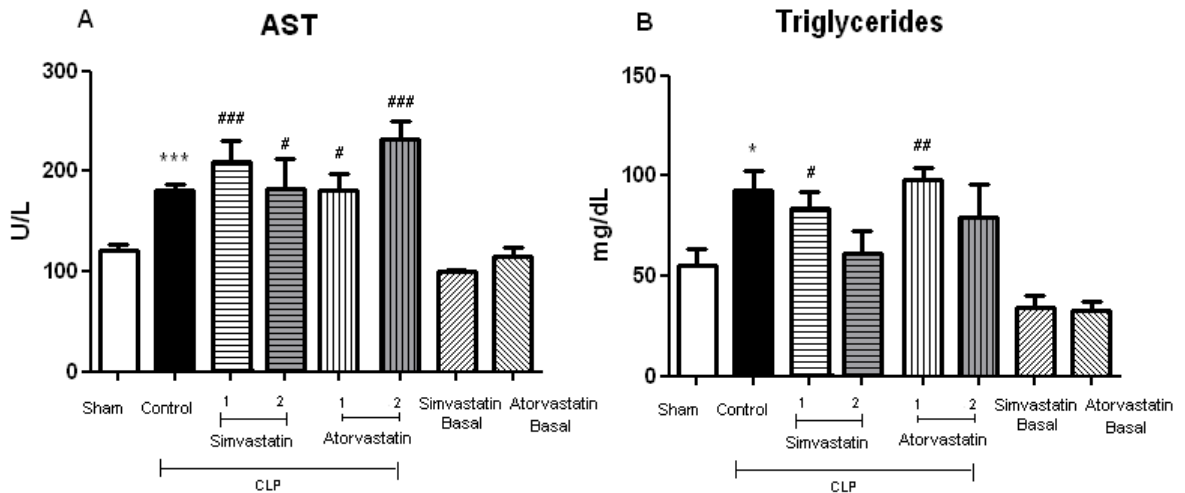


Figure 1. Parameters of plasma biochemistry measured 24 hours after CLP model in rats submitted to 30 days-treatment with statins. (A) aspartate aminotransferase (AST); (B) triglycerides. ANOVA and Newman-Keuls. Symbols: * comparison with Sham; # comparison with basal groups; * and # p<0.05; ** p<0.01; *** and ### p<0.001.

3.2 Effect of sepsis and statins on hepatic oxidative stress parameters.

Control group showed reduction in Cat, SOD and GST activities when compared with Sham-operated animals that received only vehicle, showing loss of activity or depletion of these enzymes (Figure 2A, 2B and 2C). This reduction was not reversed by statins treatment. Moreover, it was observed an increase in Cat, SOD and GST activities and GSH level in Simvastatin 2 when compared to Simvastatin Basal group, as well as Atorvastatin 2 when compared to Atorvastatin Basal group (Figure 2A-D). This is another way to observe the differences among septic and non-septic groups. For Cat and GSH we observed an increased activity of this enzyme and substrate, respectively, when comparing Sham to Basal groups. This result may reflect the antioxidant activity of statins *per se*. No differences were noted among groups in hepatic LPO level (data not shown).

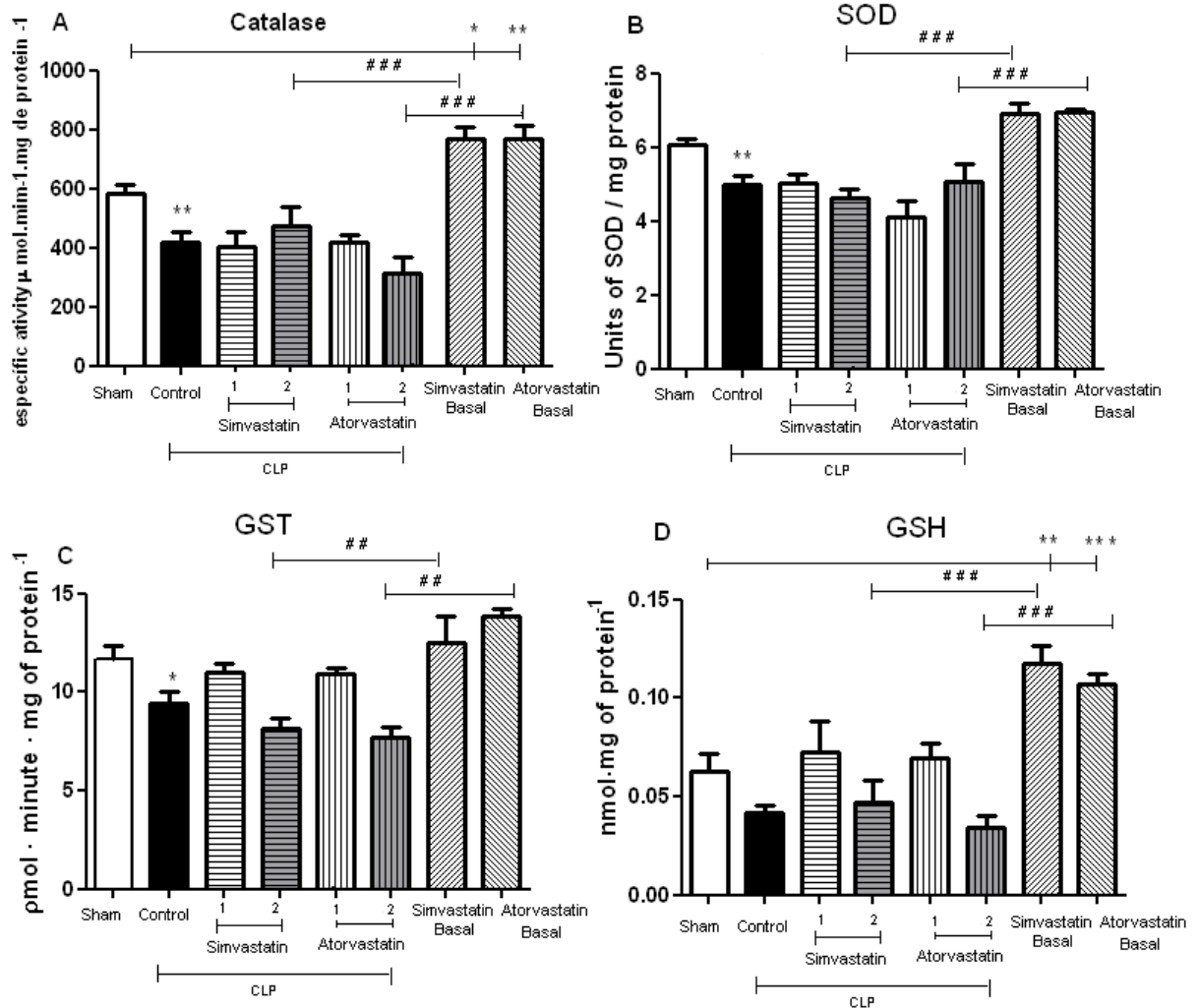


Figure 2. Biomarkers of hepatic oxidative stress in samples collected 24 h after CLP model in rats submitted to 30 days-treatment with statins. (A) Catalase, (B) Superoxide-dismutase (SOD), (C) Glutathione-S-transferase (GST), (D) Reduced glutathione (GSH). ANOVA and Newman-Keuls. Symbols: * comparison with Sham; # comparison of treated septic groups with treated non-septic groups; * and # $p < 0.05$; ** and ## $p < 0.01$; *** and ### $p < 0.001$.

3.3 Mitochondrial enzymatic activity. Since mitochondria can produce oxygen reactive species and can also be damaged by them, the activity of mitochondrial enzymes were measured as complementary results described in item 3.2. Expressive reduction in oxygen flux through NADH oxidase was observed in Control group when compared to Sham. This reduction was partially reverted in statins-treated groups (Figure 3A). Similar result occurred concerning the succinate oxidase activity, but statistic significance was observed only between Atorvastatin 2

group and Control group (Figure 3B). Simvastatin did not change the reduction of succinate oxidase activity induced by sepsis.

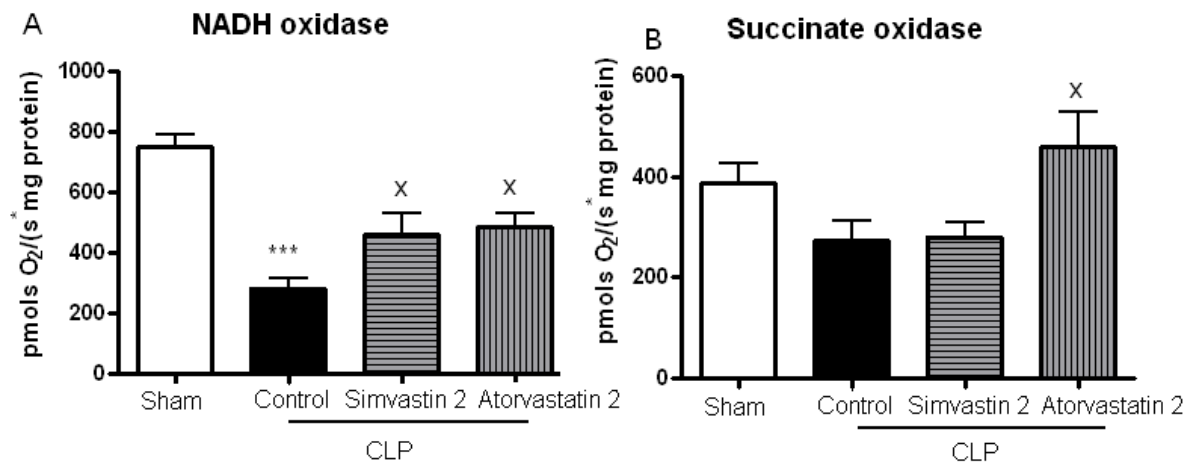


Figure 3. Mitochondrial enzymatic activity in liver of rats treated with statins and submitted to CLP model. (A) NADH oxidase; (B) Succinate oxidase. ANOVA and Newman-Keuls. Symbols: * comparison with Sham; X comparison with control. X p<0.05; *** p<0.001.

3.4 Histological analysis. Considering the alterations observed in liver functions through plasma biochemistry, activity of antioxidant enzymes and mitochondrial respiration, we investigated if the statins and sepsis could also induce alterations in liver morphology. This analysis showed that differences among Sham and Control group are subtle. Control livers showed focal microsteatosis, slight tumefaction and capsular infiltrate (Figure 4; Table 1). Both statins did not avoid these liver histological alterations.

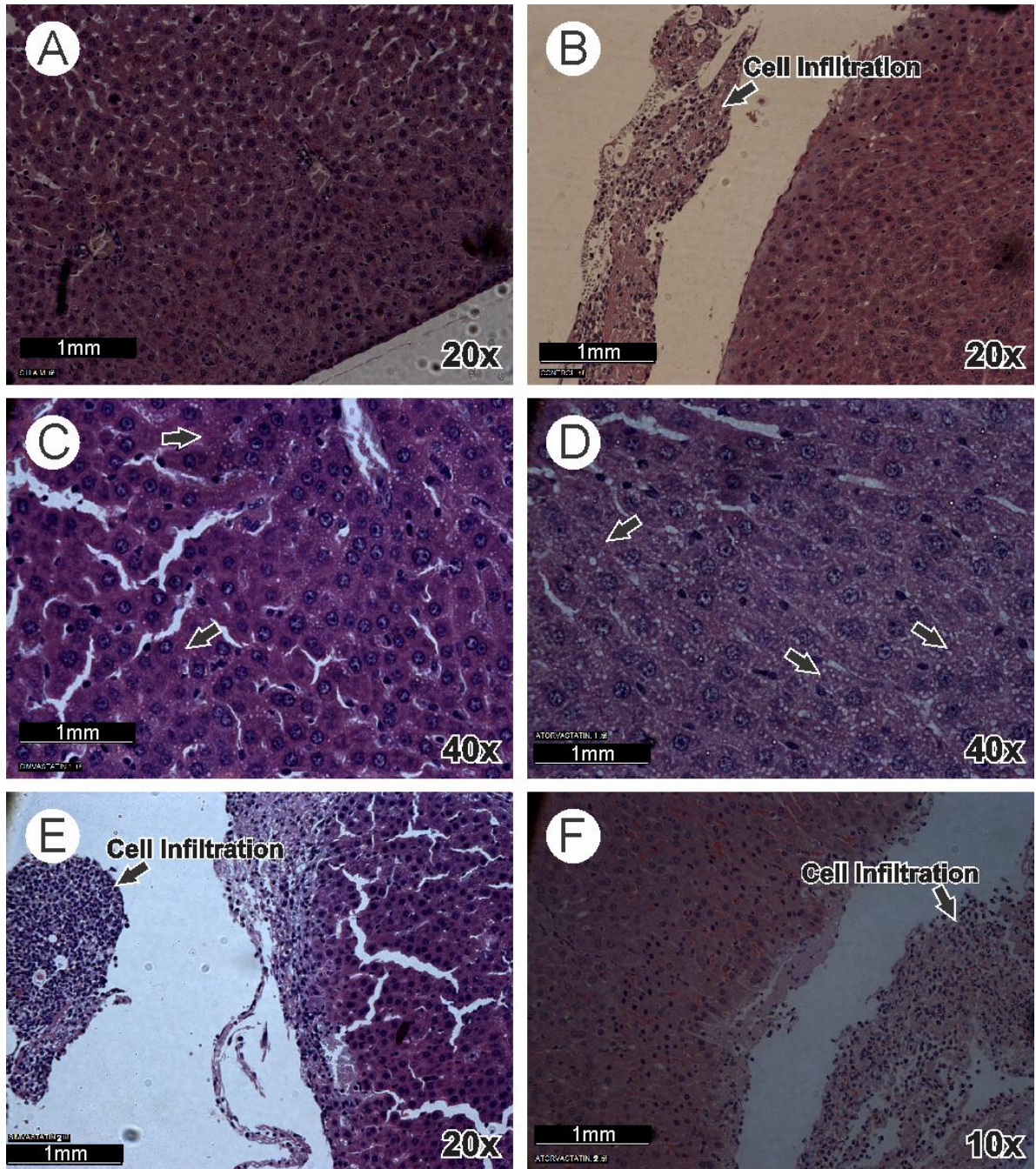


Figure 4. Hepatic histology evidenced 24 h after CLP model in rats previously submitted to 30-days statins treatment. (A) Sham, (B) Control, (C) Simvastatin 1, (D) Atorvastatin 1, (E) Simvastatin 2, (F) Atorvastatina 2. Normal liver is showing in A. Capsular infiltration of inflammatory cells is evident in panels B, E and F while microsteatosis is present in panels C and D (arrows). Scale bar = 1 mm.

Table 1. Hepatic histology lesions found 24 h after CLP model in rats previously submitted to 30-days statins treatment.

Group	Microesteatosis	Capsular Infiltration	Tumefaction
Sham	-	-	-
Control	+	++	+
Simvastatin 1	++	+	+
Atorvastatin 1	+	+	+
Simvastatin 2	+	++	-
Atorvastatin 2	+	+	+

Groups: Sham = Laparotomy. Control = cecal ligature and puncture (CLP). Simvastatin 1 = CLP + 1.17 mg/kg Simvastatin. Atorvastatin 1 = CLP + 0.59mg/kg Atorvastatin. Simvastatin 2 = CLP + 5.85 mg/kg Simvastatin. Atorvastatin2 = CLP + 2.95 mg/kg Atorvastatin.

3.5 Leukocytes presence in peritoneal cavity and blood. Since statins did not change the inflammatory cell infiltration in liver induced by sepsis, we wonder if the leukocyte migration to peritoneal cavity or the pattern of leukocyte counting in blood could be influenced by those drugs. An inversely correlation was observed between the total number of leukocyte present on blood and on peritoneal fluid in Sham and Control rats. Septic rats showed a higher number of leukocytes in peritoneum and, in contrast, lower number of cells were counted on blood (Figure 5A, D). PMN leukocytes intensively migrated to peritoneum 24 h after CLP, representing the highest amount of cells in this cavity (Figure 5F). Both statins did not change significantly the pattern of leukocytes present on blood or peritoneal cavity induced by the CLP model.

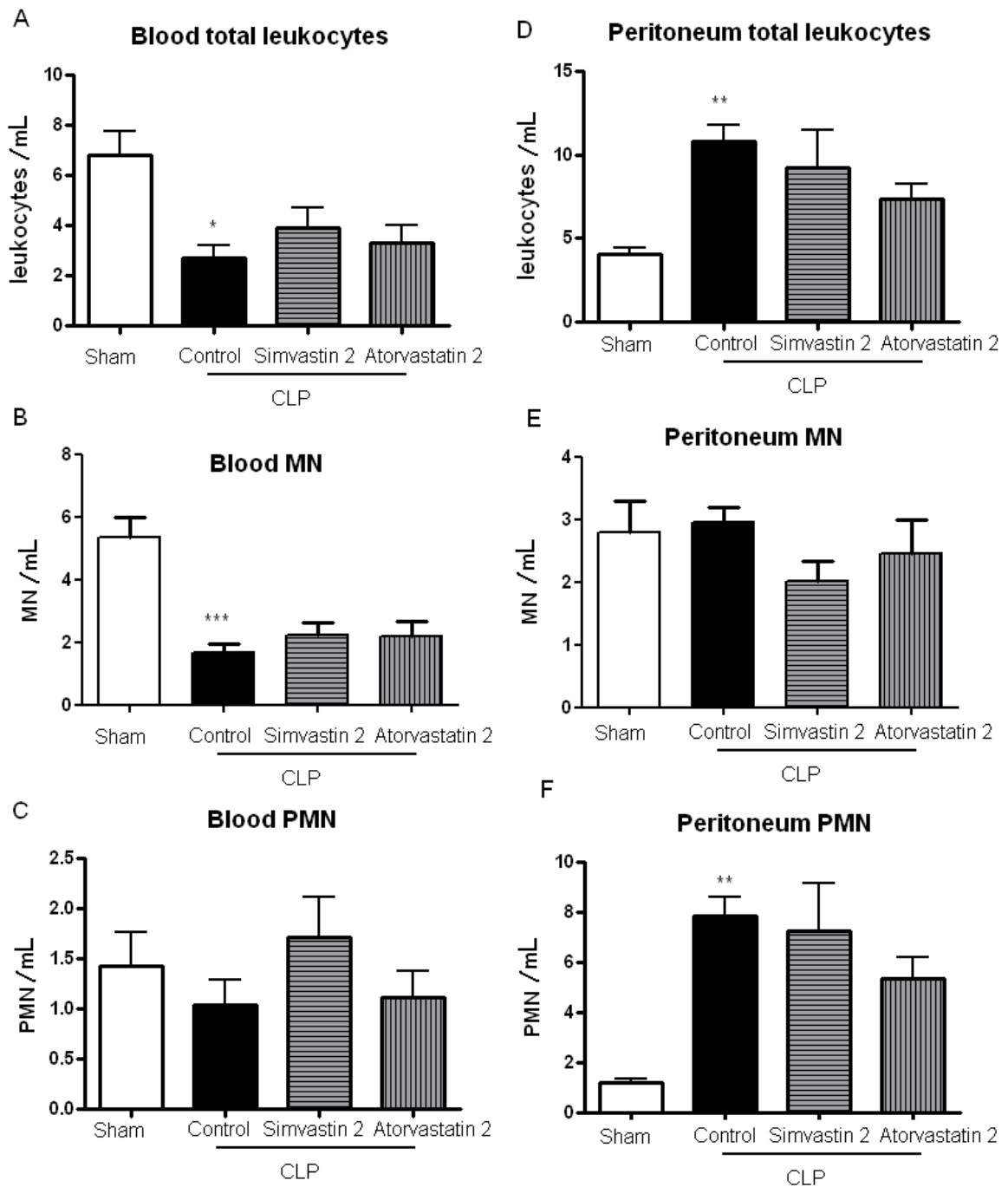


Figure 5. Leukocyte in blood (A, B and C) and peritoneal liquid (D, E and F) in response to the CLP model and treatment with statins in rats. One-way ANOVA and Newman-Keuls. Symbols: * comparison with Sham. * p<0.05, ** p<0.01.

3.2 *Gene expression of SOD-1 and TNF-2 in liver and plasmatic level of TNF α .* The expression of hepatic *SOD-1* and *TNF-2* were evaluated through quantification of mRNA by RT-PCR. The results demonstrated reduction in *SOD-1*

expression induced by both CLP and statins, mainly in Simvastatin 1 and Atorvastatin 2 groups (Figure 6A). On the other hand, the expression of *TNF-2* did not show any alteration between groups (Figure 6B). Despite lacking of significance in *TNF-2* expression in liver, the plasmatic level of $TNF\alpha$ was higher in Atorvastatin 2 group (Figure 6C).

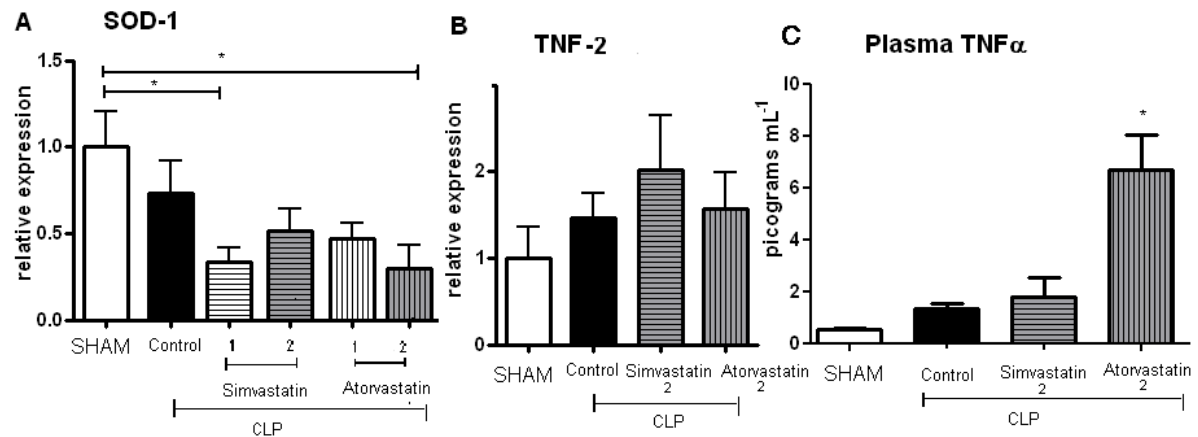


Figure 6. Gene expression of hepatic *SOD-1* and *TNF-2* and plasmatic level of $TNF\alpha$ in response to the CLP model and treatment with statins. (A) *SOD-1* expression; (B) *TNF-2* expression; (C) Plasmatic $TNF\alpha$. One-way ANOVA and Newman-Keuls. Symbols: * comparison with Sham. * $p < 0.05$.

4. Discussion

In this study, a polymicrobial sepsis was induced by CLP in rats to investigate the effects of statins. This model mimics the sepsis in human, caused by pathogens derived from the intestinal tract, and is considered to closely simulate clinical situation (25). Sepsis is a syndrome characterized by a systemic inflammatory response to infection resulting in acute organ dysfunction with high mortality rate (1). The liver plays a major function in host defense in sepsis. Kupffer cells scavenge bacteria, and produce and clean cytokines. During sepsis, hepatocytes modify metabolic pathways, increasing gluconeogenesis, to ensure cellular repair, and increase synthesis and release of coagulant factors, complement factors and antiproteolytic enzymes (4). Regardless of considerable efforts in searching for new

therapeutic options to sepsis, several pharmacological drugs and protocols have been shown to be inefficient to reduce mortality. Although there are many data suggesting a beneficial effects of treatment with statins in severe clinical conditions, such as sepsis, but a consensus does not exist about that in the scientific literature. In the present study we analysed this possibility evaluating several parameters related to liver function, once hepatocytes are the main site of action of statins, at least with respect to their CHO lowering, HMG CoA-reductase inhibitory activity (26). Despite of this well-established effect of statins, our data showed that both tested drugs did not reduce plasmatic levels of CHO. These results were not a surprise since statins are less effective in lowering plasma CHO levels in murine models as they are in human beings (27). Endotoxins are capable to cause hypertriglyceridemia (28) and that seems to be an explanation for increased level of plasma TG found in septic groups. The alteration of plasma lipids found 24 h after sepsis was probably generated by disturbance in lipid metabolism in hepatocytes, which was evidenced in liver histology as steatosis. All animals submitted to CLP model, Control or even treated with low and high doses of simvastatin and atorvastatin, showed some degree of microsteatosis. Presence of liver microsteatosis is consistent with previous literature findings in sepsis induced by CLP (29) or LPS (lipopolysaccharide) in rats (30).

Histological analysis also demonstrated other hepatic alterations in endotoxemic groups, even though they are subtle. The lesions were represented by reduction in sinusoids lumen, indicating slight tumefaction, and capsular infiltration of inflammatory cells. These lesions were found in all of septic groups and were not prevented by statins treatment. Neutrophils are the first cells to migrate to the site of infection, where they produce reactive oxygen and nitrogen species in order to kill

the infectious agents. These neutrophils and the resident cells also produce inflammatory cytokines, such as $\text{TNF}\alpha$, which can recruit and activate inflammatory cells (31), a condition that can amplify and extend the initial systemic inflammatory response.

In the present study, migration of inflammatory cells to the liver caused by CLP was also accomplished by migration of these cells to peritoneal cavity, where expressive amount of leukocytes were evidenced. Proportionally, significant reduction in blood leukocytes of septic rats was also observed. This finding is compatible with sepsis, because leucopenia is one of the most common clinical signs of endotoxemia (32). Differential counting of leukocytes showed decrease in MN leukocytes on blood and increase PMN cells on peritoneum. Our data are compatible with VENET *et al* (33), that demonstrated lymphopenia as the major sign during sepsis. Regarding to cell migration, ZHANG *et al* (34) demonstrated an intense effect of simvastatin in attenuate neutrophil infiltration in the septic lungs. Other data suggest that statins reduce endothelial adhesiveness, by inhibition of adhesion molecules proportionally to the time of pre-treatment. Those molecules mediate leukocyte rolling, adhesion and transmigration. The authors consider that as a benefic effect of statins, because mononuclear cell adhesiveness is an important contributor to sepsis pathophysiology. After migration, tissue damage may occur in consequence of superoxide and leukocyte proteases release (6; 7). In other hand, failure in neutrophil rolling, adhesion and migration is also related with higher mortality and increased numbers of bacteria in blood and peritoneal exudates (35; 36). This failure seems to be mediated by cytokines, like $\text{TNF}\alpha$ and IL-8, by a mechanism dependent of nitric oxide (37), and also IL-33 (36). Several types of cells have receptors for $\text{TNF}\alpha$ and their interaction results in broad range of

inflammatory responses (27). Our data did not show difference in expression of *TNF-2* in the liver, but significant amount of $TNF\alpha$ was found in the plasma of Atorvastatin 2-treated rats (Figure 6B and C). This result can be explained by different hypothesis: (a) peripheral level of $TNF\alpha$ is not correlated with cytokine content at the mRNA level in hepatocytes, since $TNF\alpha$ is secreted by other macrophages and not only by Kupffer cells; (b) $TNF\alpha$ plays a central role in initiating systemic inflammation, but samples of blood were collected 24 h after CLP and not in the first hours *post-sepsis*; (c) attenuation of peripheral $TNF\alpha$ by atorvastatin can occur only if this statin is administered after the induction of sepsis and not previously, as it was used in this work; (d) high dose of atorvastatin (2.95 mg/kg) can precipitate inflammatory response and release increased amount of $TNF\alpha$ in CLP model; and (e) cytokines can also play antiinflammatory activities (2). In fact, if $TNF-\alpha$ were inhibited by administration of $TNF-\alpha$ antibodies or using p55 ($TNF-\alpha R I$)-deficient mice, the mortality is increased (38). From the presented data, the exact mechanism for those results cannot be inferred.

Both transaminases ALT and AST are markers of hepatocyte damage. In septic groups we observe an increase in AST activity in plasma, but this increase was not reversed by statins treatment. Differences in ALT activity were not observed among groups. ALT is an enzyme present in hepatocytes cytoplasm; on the other hand AST is present in mitochondria besides the cytoplasm. Moreover, AST has activity in liver, heart, kidneys, pancreas, muscles and erythrocytes. Therefore, the increased level of plasma AST can indicate occurrence of a major damage in mitochondria of hepatocytes or significant damages in other organ. When the oxygen flux in mitochondria isolated from liver samples was analyzed, reductions were observed in activities of NADH- and succinate oxidase of Control

group compared to Sham-operated animals, in order of 62% and 30%, respectively (Figure 3A). The reduction in the mitochondrial enzyme activities was partially prevented by statins treatment. In this sense, atorvastatin was more effective, because it recovered 27% and 100% of NADH- and succinate oxidase activities, respectively. During sepsis, the inflammatory response and oxidative stress promote mitochondria dysfunction leading to cell death (39). It has been described that improvement in mitochondrial respiration is associated with recovery of organ function in patients with sepsis (40). Therefore, in the present study, that was the most expressive result capable to indicate a beneficial action of treatment with statins before the sepsis induction. Additionally, the results obtained with hepatic mitochondria indicated that the source of elevated AST in plasma of endotoxemic rats could be, at least in part, originated from different cell types more than hepatocytes.

Despite of the uncertain source of increased level of plasma AST, alterations in parameters related to hepatic oxidative stress indicate that the liver function was damaged by sepsis. Depletions in hepatic Cat, SOD, GST and GSH were observed in septic groups comparing with non-septic groups, showed an impairment of redox balance promoted by CLP model. However, it was not observed protective effect of statins treatment. On the other hand, the activity of Cat and GSH level were increased in treated non-septic groups (Basal groups) comparing with non-treated non-septic group (Sham group). This result is compatible with the antioxidant effect of statins already suggested in the literature (5). However, the sepsis induced by CLP suppressed the antioxidant effect of statins, installing an oxidant condition in hepatocytes. This can be caused, at least in part, by reduction in the gene expression of *SOD* in liver. Neither simvastatin nor atorvastatin modified the gene

expression of *SOD* in septic rat liver, failing to demonstrate antioxidant action through this enzyme (Figure 6A).

Finally, taking in account all data observed in the conditions of the presented experiments, the only improvement observed with statins treatment was on liver mitochondrial enzymes of animals submitted to sepsis conditions. In most parameters evaluated, both simvastatin and atorvastatin, in low and in high dose, failed in protecting the liver against injuries induced by CLP in rats, at least when statins were used as unique drug in pre-therapy of sepsis. Several drugs and endogen mediators have being studied in sepsis, such as terbutaline (41), resolvin D2 (42), glutamine (29) and albumin (43). Considering that the therapy of sepsis is conducted with a combination of drugs, the association of statins with other drugs, such as antibiotics and antiinflammatories should be considered in future studies involving sepsis.

5. Acknowledgments

The authors express their gratitude to REUNI / CAPES for the financial support, to Prof. Álvaro Réa Neto (UFPR) for the initial ideas and discussions.

6. References

1. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine* 348:138-150, 2003.
2. Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radical Biology & Medicine* 33 (9): 1173–1185, 2002.
3. Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *The Journal of the American Medical Association* 271 (3): 226-233, 1994.
4. Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Critical Care Medicine* 29(7):S42–S47, 2001.
5. Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL, Hazen SL. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* 108:426–431, 2003.
6. Merx MW, Liehn EA, Graf J, Van de Sandt A, Schaltenbrand M, Schrader J, Hanrath P, Weber C. Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation* 112 (1): 117-124, 2005.
7. McGown CC, Brookes ZLS. Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. *British Journal of Anaesthesia* 98 (2): 163–175, 2007.

8. Falagas ME, Makris GC, Matthaiou DK, Rafailidis PI. Statins for infection and sepsis: a systematic review of the clinical evidence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61(4): 774–785, 2008.
9. McGuigan PJ, O'Kane, CM, McAuley DF. Benefits of statins in the critically ill: promising but not proven. *Critical Care Medicine* 39(6):1599-1600, 2011.
10. Slotta JE, Laschke MW, Schilling MK, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Simvastatin Attenuates Hepatic Sensitization to Lipopolysaccharide After Partial Hepatectomy. *Journal of Surgical Research* 162(2): 184–192, 2010.
11. Matsuda N, Hayashi Y, Takahashi Y, Hattori Y. Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase is diminished in mesenteric arteries from septic rabbits depending on the altered phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway: reversal effect of fluvastatin therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319(3):1348-1354, 2006.
12. Russo MW, Scobey M, Bonkovsky HL. Drug-induced liver injury associated with statins. *Seminars in Liver Disease* 29 (4): 412-422, 2009.
13. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine* 29(7):1303-1310, 2001.
14. Pachaly JR, Brito HFV. Interspecific allometric scaling. In: Fowler ME, Cubas PR. *Biology, medicine and surgery of south american wild animals*. Ames: Iowa University, pp.475-481. 2001.
15. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121-126, 1984.
16. Gao R, Yuan Z, Zhao Z, Gao X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45(1):41-45, 1998.

17. Habig WH, Papst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139, 1974.
18. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26(10):853-856, 1991.
19. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* 25(1):192-205, 1968.
20. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1,2): 248-254, 1976.
21. Voss DO, Campelo AP, Bacila M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*. 4: 48-51, 1961.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–275, 1951.
23. Singer TP, Gutman M. The DPNH dehydrogenase of the mitochondrial respiratory chain. *Advances in enzymology relates areas of molecular biology* 34:79-153, 1971.
24. Gnaiger E. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph, and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*, Edited by James Dykens and Yvonne Will Copyright ©2008 John Wiley & Sons, Inc.: pp. 327-352.

25. Otero-Aton E, Gonzales-Quintela A, Lopez-Soto A, Lopez-Ben S, Ltova I, Perez LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *European Surgical research* 33(2): 77-79, 2001.
26. Brealey DA, Singer M, Terblanche M. Potential metabolic consequences of statins in sepsis. *Critical Care Medicine* 39(6):1514-1520, 2011.
27. Fraunberger P, Gröne E, Gröne HE, Walli AK. Simvastatin reduces endotoxin-induced nuclear factor b activation and mortality in guinea pigs despite lowering circulating low-density lipoprotein cholesterol. *Shock* 32(2): 159-163, 2009.
28. Feingold KR, Staprans I, Memon RA, Moser AH, Shigenaga JK, Doerrler W, Dinarello CA, Grunfeld C. Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *Journal of Lipid Research* 33(12):1765–1776, 1992.
29. Oliveira MGB, Santos RS, Lima LD, Dias CM, Saber AMAB, Teodoro WR, Capelozzi VL, Gomes RN, Bozza PT, Pelosi P, Rocco, PRM. Intravenous glutamine decreases lung and distal organ injury in an experimental model of abdominal sepsis. *Critical Care* 13(3), 2009.
30. Avila TV, Bastos Pereira AL, De Oliveira Christoff A, Da Silva Soley B, Queiroz Telles JE, Eler GJ, Bracht A, Roberto Zampronio A, Acco A. Hepatic effects of flunixin-meglumin in LPS-induced sepsis. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 24(6): 759-769, 2010.
31. Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory

neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *Journal of Leukocyte Biology* 69(5): 698–704, (2001).

32. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, *et al.* American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101:1644–1655, 1992.

33. Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis MA, Darbon R, Allombert C, Mougín B, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, Monneret G. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock* 34(4):358-363, 2010.

34. Zhang S, Rahman M, Zhang S, Qi Z, Thorlacius H. Simvastatin antagonizes CD40L secretion, CXC chemokine formation, and pulmonary infiltration of neutrophils in abdominal sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 89(5): 735-742, 2011.

35. Torres-Dueñas D, Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: Effects of the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. *Shock* 25(3): 267–276, 2006.

36. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA Jr, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, McKenzie AN, Xu D, Cunha FQ, Liew FY. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nature Medicine* 16(6):708-712, 2010.

37. Alves-Filho JC, Benjamim C, Tavares-Murta BM, Cunha FQ. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 100(1): 223-226, 2005.

38. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 81(1):137-143, 2007.
39. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British Journal of Anaesthesia* 107 (1): 57–64, 2011.
40. Brealey DA, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Singer M. Recovery from organ failure is associated with improved mitochondrial function in septic patients. *Intensive Care Medicine* 29: S134, 2003.
41. Tsao CM, Chen SJ, Shih MC, Lue WM, Tsou MY, Chen A, Liaw WJ, Wu CC. Effects of terbutaline on circulatory failure and organ dysfunction induced by peritonitis in rats. *Intensive Care Medicine* 36(9):1571–1578, 2010.
42. Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, Flower RJ, Perretti M, Serhan CN. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* 461(7268):1287-1291, 2009.
43. Delaney AP, Dan A, McCaffrey J, Finfer S. The role of albumin as a resuscitation fluid for patients with sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Critical Care Medicine* 39(2):386-391, 2011.

4. Considerações Finais

Frente aos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- O modelo de CLP reproduziu com fidedignidade os sinais esperados de sepse, bem como propiciou significativas alterações hepáticas em 24 h, manifestadas por aumento de AST, aumento de estresse oxidativo, infiltrado inflamatório hepático e microesteatose hepática;
- Elevação de TG plasmático foi observada 24 horas após a indução de CLP. Este dado, aliado à microesteatose hepática, indica desequilíbrio no metabolismo lipídico associado à sepse;
- Expressiva reação inflamatória foi desencadeada pela sepse. A presença de infiltrado celular no fígado, migração de leucócitos para o peritônio, especialmente polimorfonucleares, e aumento de TNF α plasmático confirmam a resposta inflamatória induzida pela CLP;
- O tratamento pelo período de 30 dias com simvastatina e atorvastatina antes da sepse não modificou a maioria dos parâmetros supracitados. No entanto, o tratamento com estas drogas na ausência de sepse (grupos basais) melhorou o estresse oxidativo hepático, indicando atividade antioxidante das drogas *per se*, mas que não se manteve na presença da sepse;
- Diante da sepse, as estatinas promoveram incremento da atividade enzimática mitocondrial. Este resultado foi o único efeito benéfico expressivo das estatinas testadas nessa condição patológica;
- Considerando que o tratamento da sepse é feito com politerapia, os efeitos das estatinas ainda devem ser investigados através de sua associação com outras drogas já empregadas na terapia da sepse, como antibióticos, corticosteróides e vasopressores. Efeitos diferenciados e sinérgicos podem aparecer pela interação entre esses fármacos, necessitando de mais estudos para seu esclarecimento.

5. Referências Adicionais

- ABELES, A.M.; PILLINGER, M.H. Statins as antiinflammatory and immunomodulatory agents: a future in rheumatologic therapy? **Arthritis & Rheumatism**, v.54, n.2, p. 393–407, 2006.
- ABRAHAM, E.; MATTHAY, M.A.; DINARELLO, C.A.; *et al.* Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. **Critical Care Medicine**, v.28, n.1, p. 232-235, 2000.
- AJITH, T.A.; RIJI, T.; ANU, V. In vitro anti-oxidant and DNA protective effects of the novel 3- hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor rosuvastatin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.35, n.5-6, p. 625–629, 2008.
- ALANAZI, F.K. Pravastatin Provides Antioxidant Activity and Protection of Erythrocytes Loaded Primaquine **International Journal of Medical Sciences**, v.7, n.6, p. 358-365, 2010.
- ANDO, H.; TAKAMURA, T.; OTA, T.; NAGAI, Y.; KOBAYASHI, K. Cerivastatin improves survival of mice with lipopolysaccharide-induced sepsis. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.294, n.3, p.1043-1046, 2000.
- APOSTOLOVA, N.; GARCIA-BOU, R.; HERNANDEZ-MIJARES, A.; HERANCE, R.; ROCHA, M.; VICTOR, M. V. Mitochondrial Antioxidants Alleviate Oxidative and Nitrosative Stress in a Cellular Model of Sepsis. **Pharmaceutical Research**, v.28, n.11, p. 2910–2919, 2011.
- ARAÚJO-FILHO, I.; JÁCOME, D. T.; RÊGO, A. C. M. ; AZEVEDO, Í. M.; EGITO, E. S.T.; MEDEIROS, A. C.; Effect of the simvastatin in abdominal sepsis of diabetic rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.37, n.1, p.39-44, 2010.
- ASTIZ, M. E.; RACKOW, E. C. Septic shock. **The Lancet**, v. 351, n. 9114, 1501–1505, 1998.
- BONE, R.C. Why sepsis trials fail. **The Journal of American Medical Association**, v.276, n.7, p. 565–566, 1996.
- BONE, R.C.; GRODZIN, C.J.; BALK R.A. Sepsis, a new hypothesis for pathogenesis of disease process. **Chest**, v. 112, n.1, p. 235-243, 1997.
- BOZZA, F.A.; SALLUH, J.I.; JAPIASSU, A.M.; *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Critical Care**, v.11, n.2, 2007.
- BRACHT, L.; BARBOSA, C.P.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; BRACHT, A.; BERSANI-AMADO, C.A.; Effects of simvastatin, atorvastatin, ezetimibe, and ezetimibe + simvastatin combination on the inflammatory process and on the liver metabolic changes of arthritic rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.00976.x. 2011.
- CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 425-430, 2007.
- CHALASANI, N. Statins and hepatotoxicity: focus on patients with fatty liver. **Hepatology**, v.41, n.4, p. 690–695, 2005.
- CHEN, C.H.; LEE, R.P.; WU, W.T.; LIAO, K.W.; HSU, N.; HSU, B.G. Fluvastatin ameliorates endotoxin induced multiple organ failure in conscious rats. **Resuscitation**, v. 74, n.1, p.166-174, 2007.
- CRIMI, E.; SICA, V.; SLUTSKY, A. S.; ZHANG, H.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C. Role of oxidative stress in experimental sepsis and multisystem organ dysfunction. **Free Radical Research**, v. 40, n. 7, p.665-672, 2006.

DELLINGER, R.P.; LEVY, M.M.; CARLET, J.M.; BION, J. PARKER, M.M.; JAESCHKE, R. *et al.* International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v.36, p. 1394-1396, 2008.

DURANT, R.; KLOUCHE, K.; DELBOSC, S.; MORENA, M.; AMIGUES, L.; BERAUD, J.J.; CANAUD, B.; CRISTOL, J.P. Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin e and simvastatin. **Shock**, v.22, n.1, p. 34-39, 2004.

ENDO, A. The discovery and development of HMG CoA reductase inhibitors. **Journal of Lipid Research**, v.33, p.1569-1582,1992.

FONSECA, F.H.A. Farmacocinética das estatinas. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v.85, suplemento V, p.9-14, 2005.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN, B.A. G.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, n.4, p.169-180, 1999.

GIANNINI, S.D.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; ISSA, J.S. Aspectos terapêuticos das dislipidemias - Tratamento farmacológico - vastatinas: semelhanças e diferenças. **Revista Sociedade Brasileira de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.1, p. 92-99, 1999.

HARAGUCHI, G.; KOSUGE, H.; MAEJIMA, Y.; SUZUKI, J.I.; IMAI, T.; YOSHIDA, M.; ISOBE, M. Pioglitazone reduces systematic inflammation and improves mortality in apolipoprotein E knockout mice with sepsis. **Intensive Care Medicine** 34:1304–1312, 2008.

HILDEBRAND, F.; HUBBARD, W. J.; CHOUDHRY, M.A.; FRINK, M.; PAPE H.C.; KUNKEL, S. L.; CHAUDRY I.H. Kupffer cells and their mediators the culprits in producing distant organ damage after trauma-hemorrhage. **The American Journal of Pathology**, v.169, n. 3, p.784-794, 2006.

HORMANS, Y.; DESAGER, J.P.; HARVENGT, C. Biochemical changes and morphological alterations of the liver in guinea-pigs after administration of simvastatin (HMG CoA reductase-inhibitor). **Pharmacology & Toxicology**. v. 67,n. 4, p. 336–339, 1990.

JONES, A.E.; BROWN, M.D.; TRZECIAK, S.; SHAPIRO, N.I. GARRETT, J.S.; HEFFNER, A.C.; KLINE, J.A. The effect of a quantitative resuscitation strategy on mortality in patients with sepsis: a meta-analysis. **Critical Care Medicine**, n.36, n.10, p.2734–2739, 2008.

KARIMA, R.; MATSUMOTO, S.; HIGASHI, H.; MATSUSHIMA, K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. **Molecular Medicine Today**, 5:123–3, 1999.

KATZ, S.; JIMENEZ, M.A.; LEHMKUHLER, W.E. *et al.* Liver bacterial clearance following hepatic artery ligation and portacaval shunt. **Journal of Surgical Research**, v.51, n.3. p.267–270, 1991.

KONO, H.; FUJII, H.; HIRAI, Y.; TSUCHIYA, M., AMEMIYA, H.; ASAKAWA, M.; MAKI, A.; MATSUDA, M.; YAMAMOTO, M. The Kupffer cell protects against acute lung injury in a rat peritonitis model: role of IL-10. **Journal of Leukocyte Biology**, v.79, n.4, p.809-817, 2006.

KUIJK, L.M.; BEEKMAN, J.M.; KOSTER, J.; WATERHAM, H.R; FRENKEL, J.; COFFER, P.J. HMG-CoA reductase inhibition induces IL-1beta release through Rac1/PI3K/PKB-dependent caspase-1 activation. **Blood**, v.112, n.9, p. 3563–3573, 2008.

KUKLIŃSKA, A.M.; MROCZKO, B.; MUSIAŁ, W.J.; SAWICKI, R.; KOZIERADZKA, A.; USOWICZ-SZARYŃSKA, M.; KAMIŃSKI, K.; KNAPP, M.; SZMITKOWSKI, M. Hypotensive effect of atorvastatin is not related to changes in inflammation and oxidative stress. **Pharmacological Reports**, v.62, n.5, p.883-890, 2010.

LEHNINGER, A. L. Biossíntese do colesterol, dos esteróides e dos isoprenóides. **Princípios de Bioquímica**. 4.ed. Sarvier, 2006 p.808-811.

LEAVER, H.A.; YAP, P.L. ROGERS, P.; WRIGHT, I.; SMITH, G.; WILLIAMS, P.E.; FRANCE, A.J.; CRAIG, S.R.; WALKER W.S.; PRESCOTT, R.J. Peroxides in human leucocytes in acute septic shock: a preliminary study of acute phase changes and mortality. **European Journal of Clinical Investigation**, v.25, n.10, p.777–783, 1995.

MACKENZIE, I.; LEVER, A. Management of sepsis. **British Medical Journal**, v.335, n.7626, p. 929-932, 2007.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**, v.348, p. 1546–1554, 2003.

MCGOWN, C. C.; BROWN, N. J.; HELLEWELL, P. G.; REILLY, C. S. Z.; BROOKES, L. S. Beneficial microvascular and anti-inflammatory effects of pravastatin during sepsis involve nitric oxide synthase III. **British Journal of Anaesthesia** v.104, n.2, p.183–190, 2010.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, J. C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological Reviews**, v.173, n.1, p.89–97, 2000.

MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v.417, p.1–13, 2009.

NOVACK, V., TERBLANCHE, M., ALMOG, Y. Commentary. Do statins have a role in preventing or treating sepsis? **Critical Care**, v.10, n.1, p. 113, 2006.

O’Neal, H. R. Jr.; Koyama, T.; Koehler, E. A. S.; Siew, E.; Curtis, B. R. Fremont, R. D.; May, A. K.; Bernard, G. R.; Ware, L. B. Prehospital statin and aspirin use and the prevalence of severe sepsis and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 6, p 1343-1350, 2011.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. Sepsis: still going strong. **Archives of Medical Research**, v.36, n.6 p.672-681, 2005.

SALES JUNIOR, J. A. L. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, n. 1, p.9-17, 2006 .

SCHLICHTING, D.; MCCOLLAM, J.S. Recognizing and managing severe sepsis: a common and deadly treat. **Southern Medical Journal**, v.100, n.6, p.594–600, 2007.

SEZER, E. D.; SOZMEN, E. Y.; NART, D.; ONAT, T. Effect of atorvastatin therapy on antioxidant status and atherosclerotic plaque formation. **Vascular Health and Risk Management**, v.7, p.333–343, 2011.

SHEPHERD, J.; COBBE, S.M.; FORD, I. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. **New England Journal of Medicine**, v.333, n.16, p. 1301-1307, 1995.

SHINOZAKI, S.; INOUE, Y.; YANG, W.; FUKAYA, M.; CARTER, E. A. MING-YU, Y.; FISCHMAN, A.; TOMPKINS, R.; KANEKI, M. Farnesyltransferase inhibitor improved survival following endotoxin challenge in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.391, n.3. p.1459–1464, 2010.

SOUZA NETO, J.L; ARAÚJO FILHO, I.; REGO, A.C.; DOMINICI, V.A.; AZEVEDO, I.M; EGITO, E.S.; BRANDÃO-NETO, J.; MEDEIROS, A.C. Effects of simvastatin in abdominal sepsis in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, Suplemento 4, p. 8-12, 2006.

TROCHA, M.; MERWID, A.; CHLEBDA, E.; PIECENIEWSKA, M.; SOZAŃSKI, T.; SZELAG, A. Effect of simvastatin treatment on rat livers subjected to ischemia/reperfusion. **Pharmacological reports**, v.62, n.4, p. 757-762, 2010.

VINCENT, J.L. Hemodynamic support in septic shock. **Intensive Care Medicine**, v.27, Suppl 1, p. S80-S92, 2001.

YANG, S.; CIOFFI, W.G.; BLAND, K.I.; CHAUDRY, I.H.; WANG, P. Differential alterations in systemic and regional oxygen delivery and consumption during the early and late stages of sepsis. **The Journal of Trauma**, v.47, n.4, p.706-712, 1999.

YASUDA H, YUEN PS, HU X, ZHOU H, STAR RA. Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. **Kidney International**, v.69, n.9, p1535-1542, 2006.

YUN, N.; LEE, C.H.; LEE, S.M. Protective effect of Aloe vera on polymicrobial sepsis in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, n.6, p 1341–1348, 2009.

ZAMIN, Jr. I.; MATTOS, A. A.; MATTOS, Â. Z.; CORAL, G.; SANTOS, D.; RHODE C. The vitamin e reduces liver lipoperoxidation and fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.47, n.1, p.86-92, 2010.

ZANON, F.; CAOVILO, J. J.; MICHEL, R. S.; CABEDA, E. V.; CERETTA, D. F.; LUCKEMEYER, G. D.; BELTRAME, C.; POSENATTO, N. Sepsis na Unidade de Terapia Intensiva: Etiologias, Fatores Prognósticos e Mortalidade. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.20, n.2, p.128-134, 2008.

ZANOTTI-CAVAZZONI, S. L.; GOLDFARB, R. D. Animals Models of sepsis. **Critical Care Clinics**, v.25, n.4, p.703-719, 2009.