

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

INGRID DE ARAÚJO CAMPOS

Avaliação da atividade imunomoduladora mediada por
***Zymomonas mobilis* UFPEDA 202 (CP4)**

RECIFE

2012

INGRID DE ARAÚJO CAMPOS

Avaliação da atividade imunomoduladora mediada por
***Zymomonas mobilis* UFPEDA 202 (CP4)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Co-orientadora: Dra. Eulália de Azevedo-Ximenes

RECIFE, 2012

Campos, Ingrid de Araújo

**Avaliação da atividade imunomoduladora de *Zymomonas mobilis*
UFPEDA 202 (CP4)/ Ingrid de Araújo Campos– Recife: O Autor, 2012.**

84 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadora: Eulália de Azevedo-Ximenes

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia
Industrial, 2012.**

Inclui bibliografia

- 1. Bactérias gram-negativas 2. Sepse 3. Biotecnologia I. Silva,
Teresinha Gonçalves da II. Ximenes, Eulália de Azevedo-III.
Título.**

579.33

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-094

INGRID DE ARAÚJO CAMPOS

Avaliação da atividade imunomoduladora mediada por

***Zymomonas mobilis* UFPEDA 202 (CP4)**

COMISSÃO EXAMINADORA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves Silva (Presidente)

Departamento de Antibióticos – UFPE

Profa. Dra. Vlúdia Maria Assis Costa (1ºExaminador)

Departamento de Medicina Tropical - UFPE

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo (2ºExaminador)

Departamento de Antibióticos – UFPE

Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima (1ºSuplente)

Núcleo de Enfermagem – UFPE

Profa. Dra. Ana Maria Souto-Maior (2ºSuplente)

Departamento de Antibióticos – UFPE

Recife, ____ de _____ de 2012.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Wallace e Laurilúcia Campos
por nunca deixarem de acreditar em mim.

Aos meus tios, Helenae Luciano
que estariam muito felizes
com esta conquista.

Aos meus
irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido esta oportunidade e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus pais pelo grande amor e incentivo.

A meus irmãos, Valéria e Andréia Campos, em especial Alan Campos e Wallace Júnior por todo o apoio e paciência que me concederam.

À minha orientadora, professora Teresinha Gonçalves da Silva por todos os ensinamentos e credibilidade que depositou em mim. Agradeço por todos os recursos a mim ofertados e por sempre estar disposta a ouvir minhas dúvidas e opiniões. Admiro-a pela sua incrível humildade e por ter despertado em mim o gosto pela pesquisa.

À minha co-orientadora, professora Eulália C. P. Azevedo-Ximenes por ter aceitado me co-orientar neste trabalho, além da sua disponibilidade em me repassar seus ensinamentos e ceder seu laboratório à minha presença.

A Carlson Júnior, por ter sido meu companheiro desde o início e com quem dividi minhas angústias e alegrias. Agradeço imensamente pela sua paciência e força, pois sem você este trabalho não haveria se concretizado.

À Amanda Mesquita, uma pessoa muito especial que conheci durante este mestrado. A criatura mais solícita e paciente que já conheci. Nunca terei como agradecer por toda assistência que me deu com “nossa *Zymomonas mobilis*” e por todas as palavras de incentivo.

À minha amiga e “irmã gêmea” Luciana Arrais (Phya), por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntas. Estes momentos deram sentido à minha vida. Muito obrigada amiga!

Ao meu amigo André Barros por todas as nossas conversas e confidências. Além de sua enorme disponibilidade em me ajudar.

À minha amiga Rafaela Damasceno por ter me acolhido em sua casa e por ter compartilhado comigo um pouco da sua vida.

A todos os meus companheiros do Laboratório de Bioensaios Para a Pesquisa de Fármacos em especial Bruno Nunes, Marília Sitônio e Luana Laranjeiras. Juntos passamos por momentos incríveis, desesperadores, engraçados e inesquecíveis.

A Eryvelton Franco por ter nos auxiliado a implementar a técnica da sepse por CLP.

Aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, em especial Lucas Pacheco por todo o auxílio.

À professora Christina Peixoto e os integrantes do seu laboratório pela realização da microscopia eletrônica e pela maneira amigável que me recebeu em seu laboratório.

Aos professores Álvaro e Valéria Teixeira por terem me acolhido em seu laboratório. Agradeço especialmente à Ana Paula Castore Ismaela por toda paciência.

Aos membros da banca por terem aceitado contribuir para este trabalho.

À Suely Rodrigues, a querida Sussu, a secretária mais eficiente que conheci. Agradeço por todos os momentos engraçados que compartilhamos.

À Suzete Mendonça, por todo apoio e carinho.

Aos meus amigos da graduação em especial Karla Santana e Luma Gomes.

Aos meus amigos da pós-graduação em especial Carolina Wanderley e Gabriel Locatelli.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos, em especial aos da pós-graduação em Biotecnologia Industrial.

À minha família, em especial minhas tias que sempre me incentivaram.

Ao meu namorado Heverton Costa por ter aceitado as minhas ausências e por ter me proporcionado momentos de alegria que facilitaram bastante à concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 <i>Zymomonas mobilis</i>	04
2.2. Micro-organismos com ação imunomoduladora no trato gastrointestinal	08
2.3 Micro-organismos com ação imunomoduladora e seu uso nas patologias	10
2.4 Sepses: definições	11
2.5 Epidemiologia da sepsis	13
2.6 Fisiopatologia da sepsis	15
2.6.1 Resposta imune inicial durante a sepsis	15
2.6.2 Reconhecimento dos patógenos	16
2.7 Citocinas e quimiocinas envolvidas na sepsis	21
2.8 Sepsis e apoptose dos linfócitos	23
2.9.1 Vias da apoptose na sepsis	24
2.9 Modelos experimentais de sepsis Sepsis	26
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32

4.1 Pré-fermentação	32
4.2 Fermentação, enumeração das Unidades Formadoras de Colônias e teste de pureza	32
4.3 Animais	32
4.4 Indução da sepse letal por CLP	34
4.5 Contagem total e diferencial de leucócitos na cavidade peritoneal	34
4.6 Determinação de Citocinas no lavado peritoneal	35
4.7 Enumeração das bactérias no lavado peritoneal	35
4.8 Avaliação histopatológica	35
4.9 Avaliação da apoptose dos linfócitos no baço	35
4.10 Quantificação da mieloperoxidase	36
4.11 Análise estatística	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Avaliação da sobrevida	38
5.2 Avaliação do recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso	41
5.3 Contagem bacteriana no lavado peritoneal	43
5.4 Dosagem de mieloperoxidase no tecido pulmonar	44
5.5 Dosagem das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 e da quimiocina MCP-1 no lavado peritoneal	46
5.6 Avaliação do infiltrado inflamatório no ceco	53
5.7 Avaliação histopatológica do pulmão	54
5.8 Avaliação da apoptose dos linfócitos no baço	56
6 CONCLUSÕES	61
7 REFERÊNCIAS	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Aspectos microscópico das colônias (1000X) (A) e macroscópico das colônias de <i>Zymomonas mobilis</i> (B)	05
FIGURA 2: Visão esquemática do sistema linfático associado ao trato gastrointestinal	10
FIGURA 3: Estrutura do lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas	19
FIGURA 4: Etapas da transdução de sinal decorrentes da interação do LPS com o receptor <i>Toll</i>	20
FIGURA 5: Comunicação entre as duas vias de morte celular por apoptose	26
FIGURA 6: Efeito do pré-tratamento de <i>Z. mobilis</i> na taxa de sobrevivência de animais submetidos à sepse letal pela CLP	38
FIGURA 7: Efeito do pré-pós-tratamento de <i>Z. mobilis</i> na taxa de sobrevivência de animais submetidos à sepse letal pela CLP	39
FIGURA 8: Efeito do pós-tratamento de <i>Z. mobilis</i> na taxa de sobrevivência de animais submetidos à sepse letal pela CLP	40
FIGURA 9: Efeito do pré-tratamento de <i>Z. mobilis</i> na migração neutrofílica no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP	42
FIGURA 10: Efeito do pré-tratamento de <i>Z. mobilis</i> na migração neutrofílica no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP	43
FIGURA 11: Efeito do pré-tratamento de <i>Z. mobilis</i> na expressão de MPO no tecido pulmonar de animais submetidos à sepse letal pela CLP	45
FIGURA 12: Efeito do pré-tratamento de <i>Z. mobilis</i> na expressão de TNF- α no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP	47
FIGURA 13: Efeito do pré-tratamento de <i>Z. mobilis</i> na expressão de IL-6 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP	49
FIGURA 14: Efeito do pré-tratamento de <i>Z. mobilis</i> na expressão de MCP-1 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP	50
FIGURA 15: Efeito do pré-tratamento de <i>Z. mobilis</i> na expressão de IL-10 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP	51
FIGURA 16: Efeito do pré-tratamento de <i>Z. mobilis</i> sobre a migração de células inflamatórias no ceco de animais submetidos à sepse por CLP, sham (A), controle (B) e pré-tratamento de <i>Z. mobilis</i> (C)	54

FIGURA 17: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* sobre alterações histopatológicas no pulmão de animais submetidos à sepse por CLP, sham (A), controle (B) e pré-tratamento de *Z. mobilis* (C) 55

FIGURA 18: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* sobre apoptose dos linfócitos no baço de animais submetidos à sepse por CLP, sham (A), pré-tratamento de *Z. mobilis* (B) e controle (C) 57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Termos relacionados à sepse	12
TABELA 2: Receptores <i>Toll-like</i> , suas funções e células em que estão localizados	17

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância
APC - Célula Apresentadora de Antígeno
BASES –Estudo Epidemiológico da Sepse no Brasil
BCL-2 –Linfoma de células B tipo 2
CD14 –Grupamento de Diferenciação 14
CD4+ - Grupamento de Diferenciação 4+
CD8+ - Grupamento de Diferenciação 8+
CD95L - Ligante do Grupamento de Diferenciação 95
CDC –Centro para Controle e Prevenção de Doenças
CLP – Ligamento e Perfuração Cecal
CSH –Hidrofobicidade de Superfície Celular
EDTA –Ácido etilenodiamino tetra-acético
FASL – Ligante Fas
FTK – Fractalcina
GALT – Trato Gastrointestinal Associado ao Tecido Linfoide
HIV –Vírus da Imunodeficiência Humana
HMGB-1 - High-mobility Group Protein B1
HMG-coA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HTAB –Brometo de Hexadeciltrimetil amônio
IFN- γ - Interferon-gamma
IgA – Imunoglobulina A
Ik-B – Fator Nuclear do Peptídeo Kappa Light em Células B Inibidoras
IRAK –Kinase associada ao receptor da IL-1
KC – Quimiocina Derivada de Queratinócitos
LBP –Proteína Ligadora de Polissacarídeo
LPS – Lipopolissacarídeo
LTA – Ácido lipoteicoico
MAPK p38 –Proteína Kinase ativada por Mitógeno
MCP-1 – Proteína Químioatraente de Monócitos 1
MD-2 –Fator de Diferenciação Mieloide 2
MHC –Complexo Principal de histocompatibilidade
MPO- Mieloperoxidase
MyD88 - Fator de Diferenciação Mieloide 88
NFk-B –Fator Nuclear Kappa Beta
NK – Natural Killer
NO – Óxido Nítrico
PAF – Fator Ativador de Plaquetas
PAMPs –Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PRR- Receptor de Reconhecimento Padrão
SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
SDMO - Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos
SIRS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SSDL - Standard Swings e De Ley
Th1- T helper 1
TLR – Recptor *Toll-like*
TNFR-I –Receptor do Fator de Necrose Tumoral I
TNFR-II - Receptor do Fator de Necrose Tumoral II

TOLLIP –Proteína que Interage com *Toll*

TRAF6 –Receptor TNF Associado ao Fator 6

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFPEDA – Universidade Federal de Pernambuco Departamento de Antibióticos

RESUMO

Os micro-organismos com ação imunomoduladora afetam de maneira benéfica o organismo hospedeiro pela melhora no equilíbrio microbiano e balanço imunológico. A bactéria *Zymomonas mobilis* é reportada pelas suas propriedades antagônicas sobre leveduras e bactérias invasoras entéricas. A translocação de bactérias patogênicas, bem como a destruição da barreira epitelial do trato gastrointestinal são apontados como um dos principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento e progresso da sepse. Desta forma, investigar as propriedades imunomoduladoras de *Z. mobilis* e seu potencial combate à infecção instalada durante a sepse se faz necessário para o conhecimento dos mecanismos deste micro-organismo. Neste estudo foi avaliado o efeito da cultura de *Z. mobilis* UFPEDA 202 (10^9 UFC/mL) sobre a sepse polimicrobiana letal induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) utilizando camundongos machos albinos swiss *Mus musculus* (n=16 ou 8/grupo). O efeito profilático (10 dias, 2 vezes ao dia, via oral), terapêutico (4 dias, 2 vezes ao dia, via oral) ou a associação de ambos foi avaliado na sobrevivência de animais submetidos à sepse letal. Seis horas após a indução da sepse, metade dos animais que receberam o pré-tratamento com *Z. mobilis* e o controle foram sacrificados e tiveram a migração de neutrófilos, contagem bacteriana, TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-10 determinados no lavado peritoneal. Dosagem de MPO no tecido pulmonar também foi realizada para os grupos. Alterações histopatológicas, incluindo infiltrado leucocitário no ceco e pulmão dos animais foram avaliadas através de microscopia óptica, bem como a apoptose dos linfócitos no baço por microscopia eletrônica de transmissão. Como resultado, os dados apontam que a combinação dos tratamentos profilático e terapêutico com *Z. mobilis* aumentou em 50% a sobrevivência dos animais após 96 horas em relação ao grupo controle. Houve redução nos níveis de TNF- α e na concentração bacteriana no lavado peritoneal. Por outro lado, ocorreu aumento na migração neutrofílica, nos níveis de IL-6 e IL-10. Os níveis de MCP-1 mantiveram-se semelhantes para os grupos tratado e controle. Ocorreu redução nos níveis de MPO no grupo pré-tratado com *Z. mobilis*. A análise histopatológica do ceco demonstrou aumento da migração leucocitária no grupo pré-tratado em relação ao grupo controle. A histologia do pulmão mostrou melhora da lesão aguda para o grupo pré-tratado. Através da microscopia eletrônica observou-se que houve 83% de linfócitos apoptóticos no baço dos animais controle, diferindo do grupo pré-tratado e o grupo sham, com 24% e 19% de linfócitos apoptóticos respectivamente. Os dados obtidos neste trabalho mostram que *Z. mobilis* possui atividade imunomoduladora *in vivo* mediante ação regulatória sobre as citocinas, migração leucocitária e pela diminuição da apoptose dos linfócitos no baço. Ainda funciona como antagonista bacteriano *in vivo*, uma vez que houve redução na contagem bacteriana no lavado peritoneal. *Z. mobilis* se comportou como um micro-organismo promissor a ser utilizado na prevenção à sepse.

Palavras-chave: *Zymomonas mobilis*, imunomodulação, sepse.

ABSTRACT

The micro-organisms with immunomodulating effects beneficially affect the host organism by improving the microbial balance and balance the immune system. The bacterium *Zymomonas mobilis* is reported for its antagonistic properties on invasive enteric bacteria and yeasts. The translocation of pathogenic bacteria, as well as the destruction of the epithelial barrier of the gastrointestinal tract are noted as one of the main factors responsible for the development and progression of sepsis. Thus, to investigate the immunomodulatory properties of *Z. mobilis* and its potential to fight infection installed during sepsis is needed for the knowledge of the mechanisms of this micro-organism. This study assessed the effect of culture of *Z. mobilis* UFPEDA 200 (10^9 CFU/mL) on the lethal polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) using swiss albino male mice *Mus musculus* (n = 16 or 8/group). The prophylactic effect (10 days, 2 times a day, oral), therapeutic (4 days, 2 times a day, orally) or the association of both was evaluated on survival of animals submitted to sepsis lethal. Six hours after induction of sepsis, half of animals that received pretreatment with *Z. mobilis* and control were sacrificed and had the migration of neutrophils, bacterial counts, TNF- α , IL-6, MCP-1 and IL-10 in the peritoneal fluid. Dosing of MPO in lung tissue was also performed to the groups. Histopathological changes, including leukocyte infiltration in the cecum and lungs of animals were evaluated by light microscopy, and apoptosis of lymphocytes in the spleen by transmission electron microscopy. As a result, the data show that the combination of prophylactic and therapeutic treatments with *Z. mobilis* increased 50% survival of animals after 96 hours in the control group. Reduction in levels of TNF- α and bacterial concentration in peritoneal fluid. Moreover, occurred increase in neutrophil migration on levels of IL-6 and IL-10. The levels of MCP-1 remained similar for the treated and control groups. Occurred a reduction in MPO levels in the group pretreated with *Z. mobilis*. Histopathology of the cecum showed increased leukocyte migration in pretreated group compared to the control group. Histology showed improvement in lung acute injury to the group pretreated. Through electron microscopy it was observed that there was 83% of apoptotic lymphocytes in the spleen of control animals, differing from group pretreated and sham group, with 24% and 19% of apoptotic lymphocytes respectively. The data obtained in this work show that *Z. mobilis* has immunomodulatory activity in vivo by regulatory action on cytokines, leukocyte migration and decreased apoptosis of lymphocytes in the spleen. Still works as an antagonist bacteria in vivo, since there was a reduction in bacterial count in peritoneal fluid. *Z. mobilis* has behaved like a promising micro-organism to be used in the prevention of sepsis.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, immunomodulation, sepsis.

1 INTRODUÇÃO

A mucosa intestinal pode representar um grande sítio no início de infecção por micro-organismos invasores por ser uma porta de entrada para patógenos externos. Assim, o hospedeiro desenvolve uma série de mecanismos defensores capazes de eliminar o patógeno, o que envolve resposta imune inata e adaptativa (VAUGHAN et al., 1999). Determinados micro-organismos não patogênicos possuem capacidade de imunoestimular o hospedeiro, uma vez que podem atuar nas células intestinais, interagindo desta forma com o tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT) que começa a se formar antes do nascimento. (EBERL et al. 2009).

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa que teve estudos iniciados a seu respeito entre os séculos XIX e XX, onde Barker e Hillier isolaram esta espécie bacteriana da sidra. Lidner acrescentou conhecimentos a seu respeito em sua estada no México, onde identificou a presença desta espécie que provocava a fermentação do aguamiel, seiva do Agave mexicano. O aguamiel era utilizado pelos astecas nos rituais religiosos para prevenção e tratamento de infecções intestinais (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970). Todavia, apenas em 1936 Kluver e Van Niel nomearam taxonomicamente a espécie, e este nome é aceito até os dias atuais (SWINGS, DE LEY, 1977).

Há inúmeros estudos na literatura a respeito das propriedades fermentativas de *Zymomonas mobilis* para a produção de etanol. Alguns autores defendem que o rendimento para a produção deste álcool é até mesmo superior aquele produzido pela *Saccharomyces cerevisiae*, sendo um micro-organismo promissor para esta utilidade (ERNANDEZ, 2008). No entanto, os estudos a respeito de suas propriedades biológicas são escassos. Vários casos de cura não publicados são conhecidos, assim o Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco vinha fornecendo culturas de *Zymomonas mobilis* por solicitação médica (TORRES, 2003; JALES, 1999).

Há alguns estudos a respeito das propriedades antagônicas de *Zymomonas mobilis* frente a micro-organismo patogênicos (MESQUITA, 2008), sua caracterização como bactéria probiótica (AZEREDO, 2004), sua ação antitumoral através da levana (CALAZANS et al., 2000), suas propriedades estimulantes para as citocinas *in vitro* e proteção contra parasitas que provocam a esquistossomose (SANTOS et al., 2004). Todavia, poucos estudos foram publicados de fato. Buscamos com este trabalho,

elucidar possíveis mecanismos de ação para a atuação imunomoduladora desta bactéria frente ao modelo de sepse letal por CLP em camundongos.

A sepse é uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) associada a uma falha na resposta imune inata do indivíduo, caracterizada pela incapacidade de ativação e liberação de mediadores pró-inflamatórios, devido à infecção por bactérias (em 85% dos casos), embora fungos, vírus e parasitas possam ser responsáveis em menor frequência (YAN et al., 2004; CHUNG et al., 2003). A incidência de sepse vem crescendo e os índices de mortalidade diminuíram muito pouco, acometendo todas as idades (ABRAHAM et al., 2000; ALBERTI et al., 2002). É tida como a 10ª causa de morte no relatório do Centro para Prevenção e Controle de Doenças (CDC). Possui uma alta taxa de mortalidade correspondendo a até 51% e 18 milhões de pessoas vem a óbito por ano no mundo devido a esta complicação (MARTIN et al., 2005).

O uso de *Zymomonas mobilis* reside na sua possível capacidade de substituir a microbiota patogênica por bactérias comensais e na sua interação com o sistema imunológico (FOLIGNE et al., 2007). Uma vez que a translocação bacteriana patogênica do trato gastrointestinal para o restante do corpo pode, na maioria das vezes, ocasionar a sepse, assim como a destruição da função da barreira intestinal, o uso desta bactéria com suas prováveis ações imunomoduladoras se faz justificável. A alteração da microflora do intestino com micro-organismos não patogênicos e não invasores, além de imunomoduladores tem sido proposta como uma terapia adjuvante para reduzir os níveis de translocação bacteriana e impedir o início do sepse (EWASCHUK et al., 2007). Portanto, a finalidade deste estudo foi determinar a eficácia da cultura de *Zymomonas mobilis* em impedir ou atenuar o desenvolvimento da sepse em modelo animal, através de suas propriedades moduladoras sobre o sistema imune.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis são bactérias Gram-negativas (figura 1 A), anaeróbias facultativas, frequentemente móveis, de 1 a 4 flagelos polares e não esporulantes. Em sua morfologia, apresentam-se como bastonetes grossos (1 a 1,5 µm de largura) e curtos (2 a 6 µm de comprimento). Podem ser encontrados isolados ou em pares, e ainda mais raramente em cadeias com poucas unidades (FALCÃO DE MORAIS, 1983; ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2009; GONCALVES DE LIMA, 1968).

Entre os séculos XIX e XX os consumidores de sidra tornaram-se mais exigentes, preferindo aquelas com sabor mais adocicado. Os fabricantes encontraram dificuldade, pois estas sidras facilmente desenvolviam uma “doença” devido a uma fermentação secundária. Desta forma, Barker e Hillier isolaram uma cepa bacteriana desta sidra, a *Zymomonas mobilis*. Entretanto, devido a falta de uma taxonomia latina, estes pesquisadores não avaliaram a descrição desta bactéria (BARKER, HILLIER, 1912; BARKER, 1948; SWINGS, DE LEY, 1977).

Entre 1923 e 1924, durante sua estadia no México, Lindner estudou a fermentação do aguamiel, que é a seiva açucarada do *Agave*. Este fermentado é utilizado para obtenção de uma bebida típica denominada pulque, contendo de 4 a 6 % de etanol. Lindner descobriu uma bactéria causadora da fermentação, a qual denominou *Termobacterium mobile*. Esta passou a ser denominada *Zymomonas mobilis* a partir de 1936 por Kluyver e Van Niel (SWINGS, DE LEY, 1977).

Diversas cepas de *Zymomonas* foram isoladas do suco fermentado do caldo-de-cana-picado por Gonçalves de Lima e outros pesquisadores do Nordeste brasileiro. Desta forma, estas cepas foram denominadas *Z. mobilis* variedade *recifenses* (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970; SWINGS, DE LEY, 1977).

Observou-se a ocorrência de *Z. mobilis* em diversas localizações mundiais, dentre elas a Europa, onde a bactéria foi isolada de vinhos de maçã e contaminantes na indústria de cerveja. Na África, Américas e Ásia através do fermentado de vinhos de seiva de palmas (MILLIS, 1956; CARR, PASSMORE, 1971; DADDS, MARTIN, 1973; CARR, 1974).

Z. mobilis são capazes de crescer em pH variando entre 3,5 e 7,5. Alguns autores encontraram uma temperatura ótima de crescimento para este micro-organismo de 25 a 31 °C (MILLIS, 1951). De acordo com Gonçalves de Lima et al., (1970) as cepas CP1, CP2 e CP3 var. *recifenses* crescem bem entre 25 e 42°C. Entretanto, Swings e De Ley (1977) constatarem crescimento das CP3 e CP4 var. *recifenses* a 38°C, mas não a 40°C.

Em meio líquido, é observada uma grande densidade celular para seu crescimento. Em meio sólido, as colônias crescem de forma lenta (acima de 48 horas) e convexa, com coloração esbranquiçada medindo de 1 a 2 mm de diâmetro (figura 1 B) (SWINGS, DE LEY, 1977).

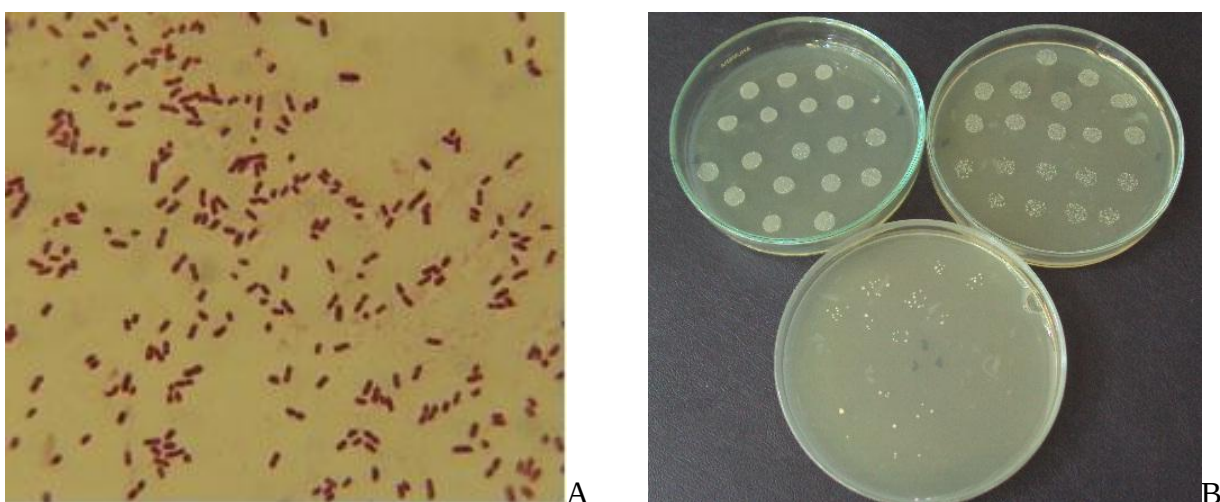


Figura 1:Aspectos microscópico e macroscópico de *Zymomonas mobilis*. Estas apresentam-se como bactérias gram-negativas, bastonetes grossos e curtos (A). Aspecto macroscópico das colônias e sua coloração esbranquiçada (B). Acervo da própria autora.

A fermentação quantitativa de hexoses em etanol e gás carbônico é característica peculiar do gênero *Zymomonas*. Após 12 a 24 horas o meio líquido torna-se turvo e com abundante formação de gás. Foi encontrada uma conversão de etanol de 1,5 a 1,9 mol/mL de glicose para 40 cepas pesquisadas por Swings e De Ley (1977). A fermentação de glicose foi muito ativa após 10 horas a uma temperatura de 30 °C. Além de etanol, pouca quantidade de ácido láctico também foi produzida e ainda houve traços de acetaldeído (SWINGS, DE LEY, 1977).

Nos últimos anos, *Z. mobilis* tem se mostrado promissora para a produção de etanol em escala industrial. Isto porque apresentam alta tolerância ao etanol, grande velocidade específica de consumo do substrato e consequentemente, um alto rendimento (RUANGLEK et al., 2006; BEAVAN et al., 1989).

Z. mobilis necessita de açúcares fermentáveis em seu meio de crescimento, tais como glicose, sacarose ou frutose (SWINGS , DE LEY , 1977). Utilizam estas fontes de carbono pela via bioquímica de Entener- Doudoroff, sendo as únicas bactérias a utilizar esta rota (GIBBIS, MOSS, 1954; VIIKARI, 1984). Esta via tem características de reação em comum com a via glicolítica clássica. A limitação da utilização de outras fontes de carbono por *Z. mobilis* para produzir etanol foi evidenciada por Behera et al., (2010) em que as flores de *Madhuca latifolia* L. foram utilizadas como fonte glicídica e *Saccharomyces cerevisiae* teve um rendimento de etanol 21,2% maior que *Z. mobilis*.

Quando utiliza sacarose como fonte energética, *Z. mobilis* é capaz de produzir um polissacarídeo, a princípio de alto peso molecular, denominado levana (JEREZ, 1993; ERNADES, 2006). Este anidofructosilfructosídio solúvel em água é utilizado pela indústria de alimentos como agente espessante, produtos dietéticos e fixador de cores (YUN, 1996).

A estabilidade da levana produzida por *Z. mobilis* 113 “S” foi avaliada por Bekers et al., (2005) e estes pesquisadores observaram que o polímero não se degrada caso a cultura líquida seja armazenada por 120 horas de 25 a 30 °C. Zikmanis et al., (2007) estudaram esta mesma cepa 113 “S” com relação as mudanças na hidrofobicidade da superfície celular (CSH) e concluíram que este valor aumentou proporcionalmente com o aumento da temperatura de cultivo e fontes de carbono no meio.

Lee e Huang (2000) avaliaram um modelo matemático para a fermentação de *Z. mobilis* ATCC 10988 a partir de glicose e sacarose presentes no meio líquido e propuseram que tal modelo foi capaz de prever a formação de biomassa, etanol e sorbitol no fermentado. Toma et al.,(2003) perceberam que a rotação (1100 rpm) aumentou o rendimento de biomassa e produção de etanol em paralelo com a diminuição da síntese de bioprodutos.

Wilks (2009) observou a influência da adição de óleo de casca de laranja à cultura de *Z. mobilis* durante 96 horas de fermentação. Seus achados indicam que a concentração do óleo capaz de inibir a produção de etanol é inversamente proporcional ao tempo de fermentação.

Gonçalves de Lima (1968) investigou a ação antagônica de *Z. mobilis* frente a diversos micro-organismos como: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Proteus morganii*, *Micrococcus citreus*, *Staphylococcus aureus* e fungos, tais como o *Aspergillus niger*. Os resultados mostraram efeitos relevantes.

Visando observar a atuação de *Z. mobilis* var. *recifenses* frente a *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis*, Wanick e Silva (1971) administraram a cultura líquida e sobre a forma de geleia em pacientes infectadas por estes micro-organismos, sendo o tempo de cura mais rápido para aquelas que receberam a *Z. mobilis* na forma de geleia (12 dias) do que na forma líquida (15 dias).

Souza e Souza (1973) impregnaram tampões vaginais com *Z. mobilis* sob a forma de geleia em pacientes portadoras de infecções por *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Staphylococcus aureus*. Estes tampões eram trocados a cada 24 horas e o tratamento durava de 6 a 10 dias. Houve recuperação da coloração da mucosa vaginal bem como o desaparecimento dos sintomas clínicos das colpites e vulvovaginites nas pacientes tratadas.

A ação de *Z. mobilis* var. *recifensis* frente a enterocolite bacteriana foi avaliada por Lopes et al., (1980). Os pacientes foram tratados com três doses diárias durante 10 dias. Coproculturas foram realizadas anterior e posteriormente ao tratamento, constatando-se melhoras na sintomatologia e diminuição acentuada da infecção bacteriana.

Bacelar (1997) avaliou a ação da cultura de *Z. mobilis* em camundongos com peritonite bacteriana e encontrou uma diminuição de 60 para 33% na taxa de mortalidade além de amenização da formação de abscessos.

Calazans et al., (1997) estudou a ação antitumoral de levanas de diferentes cepas de *Z. mobilis* em camundongos albinos swiss, encontrando uma inibição de 74% para o carcinoma de Ehrlich e 54% para o sarcoma 180 quando tratados com levana obtida a partir da *Z. mobilis* CP4. A cepa ZAP apresentou inibição tumoral de 59% para o sarcoma e de 63% para o carcinoma.

Jales (1999) estudou o efeito antimicrobiano da cultura de *Z. mobilis* bem como seu liófilo frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Vasconcelos (2001) estudou as mesmas atividades antagônicas sobre culturas de *Candida albicans*.

Santos (2002) investigou os efeitos imunomoduladores de *Z. mobilis* sobre a produção de citocinas humanas *in vitro*. Esta pesquisadora constatou que a cultura pura promove uma imunoestimulação mais acentuada do que a levana ou apenas a massa celular.

A cultura liofilizada de *Z. mobilis* inibiu o crescimento de *Escherichia coli* produtora de β -lactamases nas primeiras horas de contato, sendo esta ação crescente com o tempo (ROCHA, 2003).

Azerêdo (2004) evidenciou que a ingestão de *Z. mobilis* CP4 por via oral em ratos Wistar não influenciou o consumo de ração nem o ganho de pesos dos animais tratados. Os testes histopatológicos não apresentaram diferenças morfológicas para o fígado, intestino e baço entre os grupos tratado e controle. A autora conclui ainda que não houve translocação bacteriana para o sangue dos animais pela cepa teste nem alteração na contagem de leucócitos totais. Desta maneira, *Z. mobilis* se comportou como micro-organismo não patogênico e também não tóxico.

Mesquita (2008) avaliou a atividade antagônica de dez linhagens de *Z. mobilis* frente a 49 micro-organismos patogênicos. Destes, *Z. mobilis* UFPEDA 355 inibiu o crescimento de 10 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, 4 de *Escherichia coli*, 7 de *Staphylococcus aureus*, 5 de *Salmonella entérica* e 1 *Salmonella choleraesuis*.

2.2 Micro-organismos com ação imunomoduladora no trato gastrointestinal

Há mais de 400 espécies bacterianas habitantes do trato gastrointestinal. A mucosa deste está em contato fechado com a microbiota local, sendo esta área a segunda maior do corpo humano, medindo de 250 a 400m², perdendo apenas para o trato respiratório (FANG et al., 2000).

A mucosa intestinal representa um grande foco de início de infecção por patógenos a partir do momento que é um portal de entrada para micro-organismos exógenos. Desta maneira, o hospedeiro desenvolve uma série de mecanismos de defesa capazes de debelar o patógeno, envolvendo resposta imune inata e adaptativa (VAUGHAN et al., 1999).

As células que participam da resposta imune contra patógenos estão localizadas especialmente nas estruturas linfáticas da lâmina própria ou membrana basal do intestino. Muitos estudos têm relatado a capacidade de certos micro-organismos estimularem o sistema imunológico do hospedeiro, uma vez que eles aderem às células intestinais e interagem com o tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal (GALT) que começa a se formar antes do nascimento (EBERL et al., 2009, CERF-BENSUSSAN, GABORIAU-ROUTHIAU, 2010).

Os eventos de regulação da resposta imune intestinal ocorrem em diversos compartimentos: agregados em folículos, placas de Peyer e distribuídos dentro da mucosa, no epitélio intestinal e em locais secretores (BRANDTZAEG, 1995). Os linfócitos T intraepiteliais apresentam um caráter predominantemente citotóxico e

imunossupressor, enquanto que as células da lâmina própria apresentam um fenótipo mais auxiliar e indutor (células B) (ISOLAURI et al., 2001).

A secreção de IgA pela mucosa do TGI é de grande importância para a resposta imune e auxilia na proteção do hospedeiro por ligar-se a uma enorme variedade de antígenos bacterianos, virais e fúngicos (DELCENSERIE et al., 2008, DE MORENO et al., 2008). A resposta imune da mucosa para bactérias comensais inclui a produção de IgA independente de linfócitos T (MACPHERSON et al., 2000). A IgA secretada é resistente à proteólise intraluminal e não ativa o sistema complemento ou as respostas inflamatórias, o que torna esta imunoglobulina ideal para proteção das mucosas (ISOLAURI et al., 2001). Há diferença entre as imunoglobulinas secretadas pelo intestino delgado e grosso. Sendo que no primeiro há presença do isotipo IgA1 e no segundo ocorre a IgA2 (SALMINEN et al., 1998).

Os anticorpos IgA presentes na mucosa do intestino são comuns a outras áreas e secreções corporais que incluem trato respiratório, lágrimas, saliva e glândulas mamárias. Desta forma, uma resposta iniciada no GALT pode afetar a resposta imunológica em outras mucosas (ISOLAURI et al., 2001).

A resposta imune inicial adaptativa pode começar nas placas de Peyer ou nos linfonodos mesentéricos (Figura 2). As células B e T ativadas podem deixar os tecidos linfoides e se direcionarem para a lâmina própria através da corrente sanguínea. As bactérias são apresentadas às placas de Peyer principalmente pelas células dendríticas (CERF-BENSUSSAN, GABORIAU-ROUTHIAU, 2010).

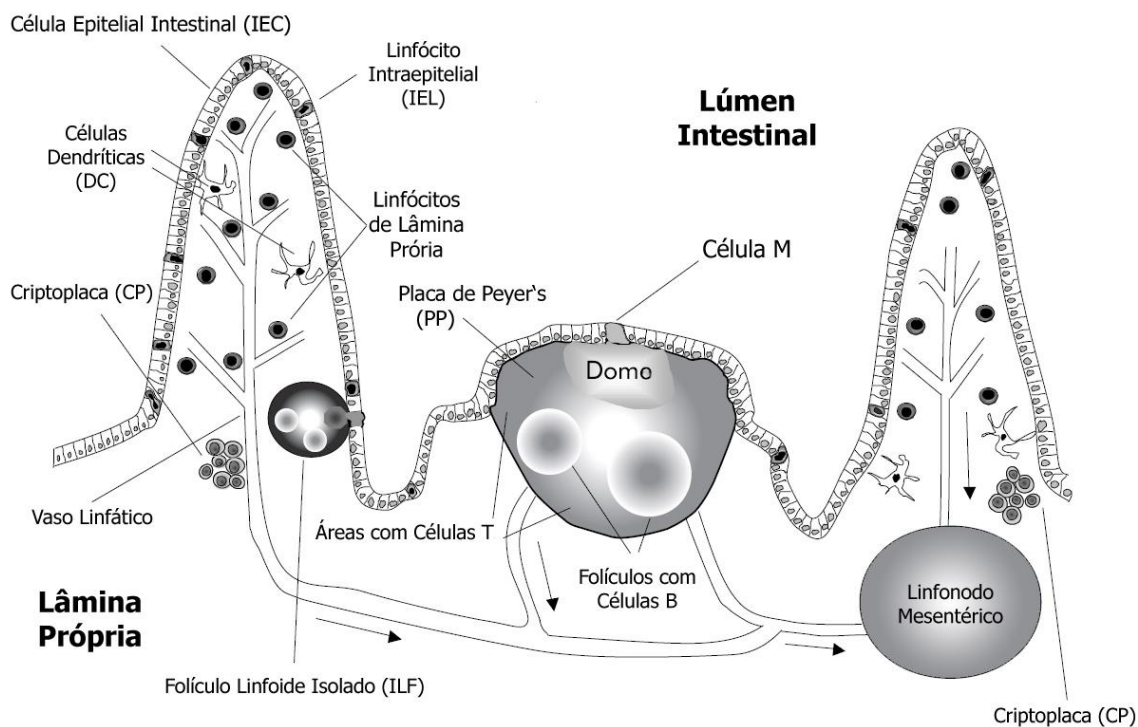


Figura 2: Visão esquemática do sistema linfático associado ao trato gastrointestinal. Placas de Peyer's e linfonodos mesentéricos são organizados no folículo linfoide intestinal. O antígeno luminal pode ser reconhecido pelas células epiteliais intestinais e por células dendríticas. A drenagem linfática das Placas de Peyer's e vilosidades da lâmina própria vai para o fluxo da linfa indicado pelas setas. Adaptado de Spahn, Kucharzik (2004).

2.3 Micro-organismos com ação imunomoduladora e seu uso nas patologias

Matsumoto et al., (2008) avaliaram a administração oral de *Bifidobacterium longum* frente a sepse em ratos causada por *Pseudomonas aeruginosa* e concluíram que esta bactéria exibiu um efeito protetor contra a infecção. Cunningham-rundles et al., (2000) estudaram se a administração oral de *Lactobacillus plantarium* 299v em crianças portadoras de HIV congenitamente iria promover um aumento dos nutrientes e melhor crescimento para os pacientes. Seus achados indicam uma melhora na resposta imune inata e seguridade para o uso desta cepa.

Fang et al., (2000) investigaram a influência da ingestão de *Lactobacillus* GG e *Lactobacillus lactis* em pacientes que receberam vacina da *Salmonella typhi* Ty21a com intuito de mimetizar a infecção e sugeriram que os *Lactobacillus* podem influenciar diferencialmente na resposta imune e que isto depende da cepa utilizada.

Diversos estudos clínicos têm demonstrado a ação profilática e ou terapêutica de micro-organismos não patogênicos com ação imunomoduladora específicos contra

gastroenterites agudas virais e diarreias associadas a antibióticos. Para este último caso, pacientes hospitalizados que receberam *Saccharomyce boulardii* apresentaram uma taxa de diarreia de 9,5%, enquanto aqueles pertencentes ao grupo controle apresentaram um índice de 22% (SURAWICZ et al., 1989; GISMONDO et al., 1999). Esta mesma cepa foi utilizada em outro estudo com 130 crianças de idades variando entre 3 meses e 3 anos a fim de investigar sua ação na diarreia aguda. Houve melhora do quadro clínico após apenas 24 horas do início do tratamento, contra 96 para o grupo placebo (CETINA-SAURI et al., 1994).

Administração de uma cepa não patogênica de *E. coli* pode ter um efeito equivalente ao fármaco padrão, a mezalasina, utilizado na terapia da colite ulcerativa (KAUR et al., 2002). Sakamoto et al., (2001) reportou que *Lactobacillus gasseri* é efetivo tanto para a supressão da bactéria *Helicobacter pylori* quanto para reduzir a inflamação da mucosa gástrica intestinal.

2.4 Sepses: definições

Sepses é uma palavra grega que significa decomposição de material orgânico, animal ou vegetal sendo que este termo foi utilizado pela primeira vez há mais de 2.700 anos por Homero (GEROULANOS et al., 2006; FUNK et al., 2009; VICENT et al., 2009). A ligação entre sepses e infecção foi introduzido a partir do século XIX por um obstetra austríaco e um cirurgião britânico, Semmelweis e Lister respectivamente (FINK et al., 2005). Em 1914, Schottmuller conceituou septicemia como sendo o aparecimento de sinais decorrentes da ação de micro-organismos no foco da infecção para a corrente sanguínea (SCHOTTMUELLER, 1914). Atualmente, sabe-se que a sepses está mais intimamente relacionada à resposta do hospedeiro ao micro-organismo causador da infecção do que às características do próprio micro-organismo (GEROULANOS et al., 2006; FUNK et al., 2009; VICENT et al., 2009).

A sepses é descrita como uma síndrome clínica bastante complexa que resulta em uma resposta ofensiva do hospedeiro contra a infecção. Inicialmente o indivíduo acometido desenvolve uma resposta, entretanto ocorre ampliação desta culminando em um acontecimento desregulado. Os sinais clínicos primários incluem: febre, confusão mental, hipotensão transitória, oligúria e trombocitopenia. Um grande número de pacientes vem a óbito mesmo nos estágios iniciais da doença, entretanto aqueles que

sobrevivem evoluem para falência respiratória ou renal, distúrbios na coagulação e hipotensão profunda (COHEN, 2002).

A sepse é representada por uma conjuntura entre infecção e resposta inflamatória do hospedeiro, podendo levar em último caso à disfunção orgânica e provável morte do indivíduo. Cada órgão que entra em falência aumenta em 15 a 20% as chances de morte do indivíduo (PÉREZ, FONCEA, 2000). Entretanto, os termos: infecção, sepse, bacteremia e choque séptico muitas vezes se confundem. Desta forma, em 1992 a Sociedade de Terapia Intensiva e o Colégio Americano de Médicos do Tórax publicou um consenso que abandonou os termos septicemia e síndrome séptica, preconizando que apenas o termo sepse deveria ser utilizado. Assim foram introduzidos novos termos que se encontram sumarizados na tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Termos relacionados à sepse. Adaptado de: Goldstein et al., (2005); ACCP/SCCM, (1992)

Termo	Definição
Bacteremia	Presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea
Infecção	Processo patológico causado pela invasão do micro-organismo patogênico a determinado tecido, fluido ou cavidade normalmente estéril do hospedeiro
Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)	Hospedeiro deverá apresentar duas ou mais das seguintes condições: - Temperatura axilar > 38° C ou < 36°C - FC > 90 batimentos/min - FR > 20 incursões respiratórias/min ou Pa CO ₂ < 32 mmHg - Leucocitose > 12.000 cél/mm ³ ou leucopenia < 4.000 cél/mm ³
Sepse	SIRS associada a suspeita ou identificação do foco infeccioso. É a resposta sistêmica do hospedeiro à infecção

Sepse grave	Sepse relacionada a manifestações de hipoperfusão tecidual e disfunção orgânica, caracterizada por acidose láctica, oligúria ou alteração do nível de consciência, ou hipotensão arterial com pressão sistólica < 90 mmHg. Entretanto, não há necessidade de agentes vasopressores
Choque séptico	Hipotensão ou hipoperfusão induzido pela seps refratária à ressuscitação volêmica adequada, e com subsequente necessidade de administração de agentes vasopressores
Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO)	Caracteriza-se pela alteração na função orgânica de forma que a homeostasia não possa ser mantida sem intervenção terapêutica. Geralmente são utilizados parâmetros dos seguintes órgãos-chave: pulmão, coração, rins, fígado e cérebro

A alta incidência da seps é muitas vezes relacionada a diversos fatores, tais como: o aumento da expectativa de vida, que de forma consequente leva ao aumento no número de pacientes idosos com enfermidades graves inerentes, ao emprego exacerbado e descontrolado de antibióticos, que resulta em um maior número de bactérias resistentes, e finalmente devido a um aumento robusto no número de procedimentos invasivos e ao crescente número de pacientes imunodeprimidos (RANGEL-FRAUSTO, 2005).

2.5 Epidemiologia da seps

Apesar de diversos estudos publicados e dos avanços nas pesquisas, a incidência da seps vem aumentando consideravelmente ao longo dos anos de forma que há uma elevação de 8,7% ao ano entre as décadas de 1979 a 2000, além de que a incidência aumentou de 82,7 casos/100.00 habitantes para 240,2/100.00 habitantes neste mesmo

período (MARTIN et al., 2003). Durante estas duas décadas as infecções por micro-organismo gram-positivos aumentou em 26,3% ao ano, totalizando 52,1% dos casos de sepse em 2000. A proporção de pacientes com falência múltipla de órgãos passou de 16,8% no período entre 1979 a 1984 para 33,6% entre 1995 a 2000 (CHALUPKA, TALMOR, 2012).

É tida como a décima causa de morte no relatório da CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) ultrapassando até mesmo as taxas do somatório dos cânceres de pâncreas, próstata, mama e colorretal (ANGUS et al., 2001). Nos Estados Unidos a incidência da sepse grave é de 750.000 casos por ano, alcançando uma taxa de mortalidade de 28,6%. Na Europa, um estudo clínico envolvendo 14.364 pacientes admitidos em 28 UTI's, mostrou que 24% das infecções hospitalares foram correspondentes a sepse grave e 30% ao choque séptico (VICENT, CARLET, OPAL, 2002).

O Índice em pacientes pediátricos é crescente, tendo uma incidência de 0,56 casos/1000 crianças no mundo, sendo 28% destes pacientes acometidos abaixo de 1 ano de idade (WATSON et al., 2003). Os Estados Unidos apresentam um índice de 170 neonatos com sepse em 1.000 nascidos vivos (CHALUPKA, TALMOR, 2012).

Estudos epidemiológicos a respeito da sepse envolvem quase que exclusivamente os países desenvolvidos (CRIBBS, MARTIN, 2009). Entretanto, este é um problema global, visto que Adhikari et al., (2010) observaram que a sepse acomete entre 15 a 19 milhões de pessoas por ano, incluindo 5 milhões na Ásia Oriental, 4 milhões no Sul da Ásia e 2 milhões na África Sub-saariana.

Nos Estados Unidos, os custos totais com pacientes internados com sepse passaram de 56,6 bilhões de dólares para 81,7 bilhões de dólares entre os anos de 2000 a 2005 (HALPERN, PASTORES, 2010).

No Brasil, o estudo BASES(*Estudo Epidemiológico da Sepse no Brasil*) desenvolvido em 5 UTI's em Santa Catarina e São Paulo evidenciou uma incidência de sepse, sepse grave e choque séptico de 46,9%, 27,3% e 23% respectivamente. Isto culminou numa mortalidade de 33,9%, 46,9% e 52,2% (SILVA et al., 2004). Um estudo multicêntrico realizado em 65 hospitais do Brasil identificou que os principais sítios de infecção nos pacientes acometidos pela sepse foram: pulmonar (69%), abdominal (23,1%) e urinário (16%) (SALES JÚNIOR et al., 2001).

Sogayar et al., (2008) realizaram um estudo multicêntrico em 21 hospitais brasileiros e concluíram que são gastos 9.973 dólares e 9.490 dólares durante a

internação do paciente nos hospitais públicos e privados respectivamente. O custo médio diário para os pacientes sobreviventes na UTI foi de 826 dólares e de 1.094 dólares para os não sobreviventes.

2.6 Fisiopatologia da sepse

2.6.1 Resposta imune inicial durante a sepse

O organismo apresenta barreiras mecânicas tais como tecido epitelial, barreiras químicas como os ácidos graxos da pele e barreiras biológicas como a própria flora intestinal. Quando essa eficiente linha de defesa é rompida os micro-organismos patogênicos invadem o organismo hospedeiro e são imediatamente reconhecidos pelas células componentes do sistema imune inato: macrófagos, eosinófilos, células Natural Killers (NK), neutrófilos e células dendríticas (JANEWAY, WALPORT, SHLOMCHICK, 2007; RUDIGER, STOTZ, SINGER, 2008).

Os macrófagos residentes dos tecidos são responsáveis pelo reconhecimento dos patógenos e pela quimiotaxia de fagócitos para o foco infeccioso. Os neutrófilos são as primeiras células que são recrutadas para o local da injúria, sendo responsáveis pela fagocitose dos patógenos. Seguidamente, o material fagocitado é eliminado por enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidos por estas próprias células (HAMPTON et al., 1998). Na primeira fase da migração neutrofílica ocorre o rolamento dos leucócitos pelo vaso sanguíneo mediado pelas chamadas selectinas. Desta forma, os leucócitos se aderem firmemente ao endotélio vascular, sendo este processo mediado pelas integrinas. Subsequentemente, o leucócito realiza a transmigração do endotélio para os tecidos (VAN ZEE et al., 1991).

Os neutrófilos ativados ao se locomoverem para o sítio infeccioso removem os agentes agressores pela combinação da fagocitose e a degranulação, podendo este processo ocasionar danos teciduais ao hospedeiro pelo “burst respiratório”. Os neutrófilos ainda têm a capacidade de ativarem por *feedback* positivo a resposta inflamatória com liberação de TNF- α e IL- β que são responsáveis pela inibição da contratilidade miocárdica, aumento da permeabilidade vascular e relaxamento da musculatura lisa (ROSENBERG, GALLIN, 1998).

2.6.2 Reconhecimento dos patógenos

O reconhecimento dos patógenos pelas células do sistema imune inato se dá por receptores chamados de reconhecimento padrão que são capazes de identificar estruturas moleculares presentes na superfície dos micro-organismos, denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Estes são provenientes de bactérias, vírus, parasitas e fungos (MEDZHITOV, JANEWAY, 2000).

Dentre os principais representantes dos receptores de reconhecimento padrão (PRR) encontram-se os *toll-like* dos mamíferos. Estes pertencem a uma família composta por proteínas de membrana que foram conservadas de forma evolutiva e identificadas nos mamíferos tendo homologia com os receptores *toll* da *Drosophila melanogaster*, sendo o nome *toll-like* derivado desta homologia (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT, JANEWAY, 1997). Na mosca adulta, o Toll produz resistência a infecções contra fungos devido a um mecanismo de sinalização envolvendo proteínas semelhantes ao NFκ-B e Iκ-B dos mamíferos (LEMAITRE et al., 1996).

Os receptores transmembranares *toll-like* são compostos por domínios repetitivos extracelulares de leucina e um domínio citoplasmático homólogo ao do receptor IL-1, sendo desta forma capaz de proporcionar a sinalização intracelular (SANDOR, BUC, 2005). Até o momento, 13 membros pertencentes à família *toll-like* foram descritos, estando 11 expressos em humanos sendo responsáveis por diferentes respostas imunes. As diferenças no reconhecimento dos patógenos e nos diversos produtos advindos das vias de sinalização entre os *toll-like* são possíveis devido a diversidade entre os domínios extracelulares (ANDERSON, 2000; HOPKINS, SRISKANDAN, 2005).

Os *toll-like*, devido a seu papel relacionado ao reconhecimento de patógenos, são expressos em monócitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células endoteliais e células epiteliais intestinais, de forma estratégica estas células estão diretamente expostas à invasão de micro-organismos patogênicos (tabela 2). Alguns componentes das famílias *toll-like* estão ligados às células da resposta imune adaptativa, estando expressos nos linfócitos B e T (MUZIO et al., 2000).

Alguns receptores *toll-like* são expressos na superfície celular, como são os TLR 1,2,4, 5 e 6, enquanto outros são expressos nas vesículas membranosas endocíticas ou até mesmo em outros compartimentos intracelulares, como é o caso dos TLR 3,7,8 e 9.

A localização celular dos TLRs está relacionada ao padrão molecular dos seus ligantes, como por exemplo, os receptores TLR 8 e 9 reconhecem especialmente ácidos nucleicos que necessitam de internalização para se ligar ao seu receptor e induzir ativação dos mecanismos responsáveis pela sinalização (AKIRA, UEMATSU, TAKEUCHI, 2006).

Tabela 2: Receptores *toll-like*, suas funções e células em que estão localizados.

Receptor <i>toll-like</i>	Função	Células em que está presente
TLR1 (AKIRA, HEMMI, 2003)	Reconhecimento de triacil peptídeos	Macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B
TLR2 (SCHWANDNER et al., 1999; SATO et al., 2003)	Ligação com glicolipídeos e peptídeoglicanos de bactérias Gram-positivas, lipoarabinomananas de micobactérias, zymozan de fungos	Monócitos, macrófagos e células dendríticas
TLR3 (ALEXOPOULOU et al., 2001; AKIRA et al., 2006)	Reconhecimento dos RNAs de fita dupla durante infecções virais	Células dendríticas maduras e células epiteliais
TLR4 (BOZZA et al., 1994)	Reconhecimento do LPS de bactérias gram-negativas	Macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e células dendríticas
TLR5 (HAYASHI et al., 2001)	Ligação com a flagelina bacteriana	Células epiteliais, monócitos e células dendríticas imaturas
TLR7 e TLR8 (AKIRA et al., 2006)	Reconhecimento de componentes antivirais sintéticos imadazoquinolínicos e alguns análogos	

	denucleotídeos de guanina	
TLR9 (BAUER et al., 2008)	Ligação ao motivo GpG não-metilado das bactérias (reconhecimento do DNA genômico bacteriano)	

A expressão dos TLRs nas células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como os macrófagos e células dendríticas é especialmente importante no início da resposta imune adaptativa. As células dendríticas tem papel fundamental na ativação das células T virgens, pois são elas as responsáveis pela apresentação do antígeno a estas células. O reconhecimento dos micro-organismos pelos TLRs inicia um processo de maturação das células dendríticas (na sua forma imatura têm pouco poder de ativação) o que resulta num aumento da expressão de MHC (complexo de histocompatibilidade principal), bem como aumento na produção de citocinas. Estes sinais provenientes das células dendríticas maduras irão induzir a ativação e proliferação das células T, levando ao desencadeamento da resposta imune adaptativa. Desta forma os TLRs desenvolvem uma ponte fundamental entre a resposta imune inata e adaptativa (IWASAKI, MEDZHITOV, 2004).

O primeiro membro pertencente à família *toll-like* identificado nos mamíferos foi o TLR4. Ele é expresso em várias células como macrófagos e células dendríticas (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT, JANEWAY, 1997). O TLR4 está relacionado ao reconhecimento das bactérias gram-negativas, ou seja, o principal receptor do LPS (endotoxina) que é responsável pelas características de uma autêntica infecção por micro-organismos gram-negativos (BOZZA et al., 1994). O LPS é composto por uma região variável de carboidratos, denominada de antígeno O. Em seguida, há uma região mais conservada chamada de cerne oligossacarídeo (2-ceto-3-ácido deoxioctônico). Finalmente, há uma região lipídica que é bastante conservada nas bactérias, o lipídio A (MUNFORD, VARLEY, 2006). O lipídio A serve para ancorar a parede celular bacteriana (Figura 3) e é a porção fundamental do LPS responsável pela ativação do TLR4 e, estando as preparações sintéticas de lipídeos A capazes de reproduzirem os efeitos biológicos bem próximos aos do LPS (GALANOS et al., 1985).

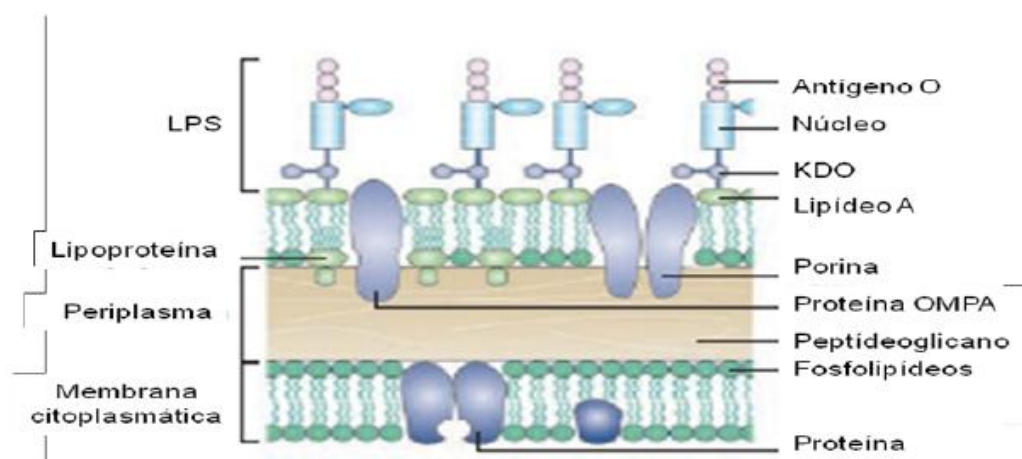


Figura 3: Estrutura do lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas. KDO: 2-ceto-3-ácido deoxioctônico (LOLIS, BUCALA, 2003).

Anteriormente, acreditava-se que o mecanismo de sinalização pelo LPS era fundamentado exclusivamente em uma glicoproteína transmembranar denominada CD14, entretanto, estudos mais recentes identificaram um outro receptor, visto que o CD14 não apresenta segmento intracelular. Observou-se camundongos C3H/HeJ que possuem uma mutação pontual natural na porção citoplasmática do TLR4 que abole a sinalização deste receptor, são incapazes de responder ao LPS através da produção de citocinas, tais como IL-1 β e TNF- α , comportando-se desta forma extremamente resistente à endotoxemia letal (GALANOS, FREUDENBERG, 1993; POLTORAK et al., 1998). O papel do CD14 como receptor para o LPS foi comprovado em estudo com animais CD14 $^{-/-}$ que apresentaram maior resistência a endotoxemia, entretanto esta resistência desaparece quando as doses de LPS são aumentadas (HAZIOT et al., 1996; Moore et al., 2000).

Sabe-se que o reconhecimento do LPS pelo complexo CD14-TLR4 envolve moléculas acessórias, tais como o LBP (proteína ligadora de LPS) capaz de transferir o LBP ao CD14 e ao MD-2 (SCHUMANN et al., 1990). Este último é uma pequena molécula que não possui região transmembrana sendo expressa na superfície da célula e interage com domínios externos do TLR-4. O reconhecimento do LPS pelo TLR-a parece estar diretamente envolvido ao auxílio do CD14 e do MD-2. A sinalização dos TLRs depende de proteínas adaptadoras específicas, como o MyD88 (fator de diferenciação mieloide), TOLLIP (proteína de interação *Toll*), IRAK (quinase associada ao receptor IL-1) e um adaptador denominado TRAF6 (fator 6 associado ao receptor de

TNF). Ocorrem várias etapas de fosforilação (Figura 4) de forma sequencial que irão culminar na fosforilação do I κ B (inibidor do fator Kappa B), o que irá liberar o NF- κ B (fator nuclear κ B). Por sua vez, este irá sofrer translocação nuclear e induzir a transcrição de vários genes responsáveis pela resposta inflamatória, que codificarão citocinas e quimiocinas, por exemplo (COHEN, 2002).

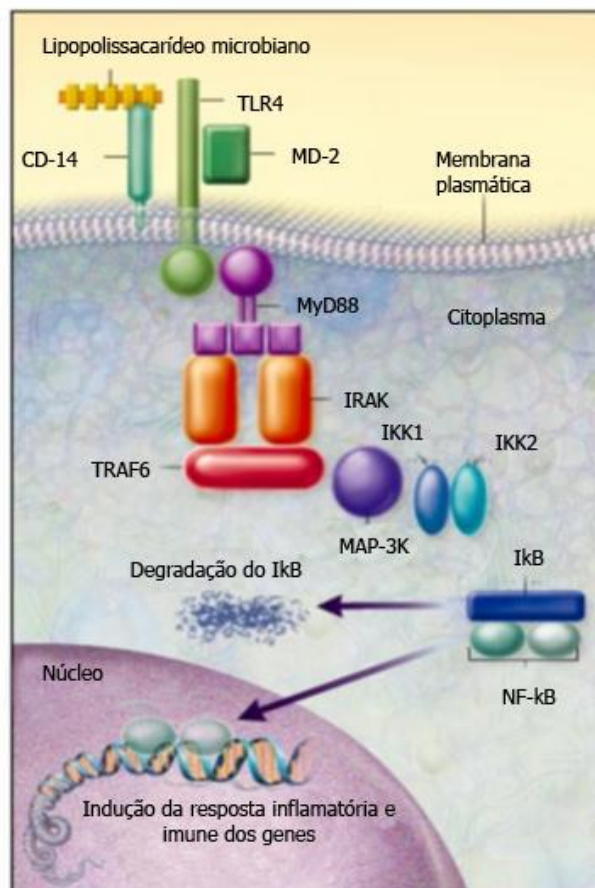


Figura 4: Etapas da transdução de sinal decorrentes da interação do LPS com o receptor *toll*. IKK1 – ikappa B kinase 1; IKK2- ikappa B kinase 2 (MEDZHITOV, JANEWAY, 2000)

Enquanto o TLR4 está envolvido com o reconhecimento das bactérias gram-negativas, o TLR2 tem um papel fundamental na detecção de bactérias gram-positivas. Estas possuem diversos componentes da sua parede celular que incluem o LTA (ácido lipoteicoico) que é um glicolípido carregado negativamente, podendo ativar o sistema imune. Há também peptideoglicanos e lipoproteínas que são imunoestimuladores. O TLR2 pode interagir com o TLR1 e com o TLR6, o que parece estar envolvido na discriminação de mudanças sutis na porção lipídica de lipoproteínas. O LTA apresenta

domínio diacilado e ativa as células através da formação de um heterodímero TLR2/TLR6 (AKIRA et al., 2006).

Estudos realizados utilizando animais TLR2^{-/-} mostraram que estes animais são altamente susceptíveis a infecção por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (TAKEUCHI, HOSHINO, AKIRA, 2000; ECHCHANNAOUI et al., 2002). Entretanto, foi demonstrado um grau de polimorfismo no gene que codifica o TLR2 humano, estando associado a uma menor resposta a diversas lipoproteínas bacteriana e ao choque séptico induzido por bactérias gram-positivas, especialmente o *Staphylococcus spp.* (COOK, PISETSKY, SCHWARTZ, 2004).

2.7 Citocinas e quimiocinas envolvidas na sepse

As células do sistema imune inato são responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios ao reconhecerem os antígenos bacterianos. Esses mediadores são chamados citocinas e quimiocinas. Nos minutos iniciais após o estímulo, são liberadas citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 (IL- β) que são responsáveis por muitos dos efeitos fisiopatológicos observados durante a sepse (COHEN, 2002).

O TNF- α é liberado principalmente por macrófagos e células epiteliais ativadas durante a sepse e possui vários efeitos biológicos, tais como: indução da liberação de proteínas de fase aguda pelo fígado, ativação de macrófagos e neutrófilos, aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais envolvidas com o rolamento dos leucócitos, em mastócitos causa a degranulação da célula e liberação de histamina (VAN OVERVELD et al., 1995; GAUR, AGGARWAL, 2003). Há dois tipos de receptores para o TNF- α : o TNFR-I e o TNFR-II. O processo de apoptose é induzido através da sinalização do receptor TNFR-I, sendo este o principal responsável pela maioria dos efeitos biológicos exercidos pelo TNF- α (MICHEAU, TSCHOPP, 2003; WAJANT, PFIZENMAIER, SCHEURICH, 2003). Nos neutrófilos, o TNF- α induz o aumento da capacidade fagocítica pela produção de superóxido e liberação de enzimas (MOVAT et al., 1987). O TNF- α medeia a indução da produção de IL-1, o que leva a produção de IL-6 (interleucina-6) e PAF (fator ativador de plaquetas). É responsável pela ativação das células endoteliais. A IL-1 induz os efeitos sistêmicos da sepse como: febre, hipotensão, choque e disfunção orgânica (CIPOLLE, PASQUALE, CERRA, 1993; FISHER et al., 1994).

A IL-6 é uma importante citocina liberada durante a sepse, sendo produzida por macrófagos, células endoteliais e neutrófilos sob estímulo infeccioso. Ela é capaz de induzir a diferenciação dos linfócitos B e ativação e proliferação dos linfócitos T. É capaz de induzir a produção de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa pelos hepatócitos (HACK, AARDEN, THIJIS, 1997). Pesquisas demonstram a IL-6 como um biomarcador da severidade da sepse, pois os seus níveis estavam elevados em cerca de 60 a 100% dos pacientes com este quadro patológico (GOGOS et al., 2000; KOX et al., 2000). Enquanto estudos mostram que a IL-6 funciona em sinergismo com o TNF- α e a IL-1 atuando de maneira pró-inflamatória (BOZZA, BOZZA, CASTRO FARIA NETO, 2005; HENGST, 2003) outras pesquisas contradizem este fato defendendo que a IL-6 inibe a síntese de IL-1 e TNF- α induzida por LPS (BARTON, 1997). Estudos mostraram que camundongos IL-6-/- foram mais susceptíveis à sepse induzida pela bactéria gram-positiva *Listeria monocytogenes* assim como a sepse pela bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (DALRYMPLE et al., 1995; DALRYMPLE et al., 1996).

O IFN- γ é responsável pela ativação de mecanismos antibactericidas através do incremento da apresentação de antígenos, fagocitose e liberação de citocinas via Th1 (T helper 1). Desta forma é uma citocina importante na resposta imune inata (SEKI et al., 2000; Qiu et al., 2001). Inicialmente, o IFN- γ foi descrito como interferente na replicação viral (ISAACS, LINDENMANN, 1957) e secretada majoritariamente por linfócitos. Todavia, atualmente sabe-se que esta citocina é também produzida pelas células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, podendo atuar de forma autócrina ou parácrina (FRUCHT et al., 2001; GESSANI, BELARDELLI, 1998).

O HMGB-1 (proteína do grupo de alta mobilidade box 1) é uma proteína citosólica e nuclear ligadora de DNA que é liberada especialmente por macrófagos após estímulo como LPS e TNF- α . Tem sido descrita como um marcador tardio da sepse (após 20-72h do estímulo) e está envolvida com o desenvolvimento da falência múltipla dos órgãos. Sua secreção ativa a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, TNF- α e IL-1. Pacientes com sepse severa, bem como animais submetidos a modelos experimentais de sepse demonstraram altos níveis desta proteína. A utilização de anticorpos neutralizantes para esta citocina em animais submetidos à sepse e endotoxemia letal protegeu estes animais (LI et al., 2004; YANG et al., 2005; WANG et al., 2004; MANTELL, PARRISH, ULLOA, 2006; LOBO, LOBO, 2007; UENO et al., 2009).

A IL-10 (interleucina-10) é uma importante citocina envolvida com a patogênese da sepse. Ela atua na maturação e na função de apresentação de antígeno de algumas células apresentadoras de antígenos (APCs). A IL-10 é produzida por linfócitos T citotóxicos (CD8+), linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos e células epiteliais. O LPS presente nas bactérias gram-negativas é um potente estímulo para a secreção de IL-10. A ligação da IL-10 ao seu receptor celular é capaz de ativar vias de sinalização que culminam na inibição da translocação nuclear de NFκ-B (fator nuclear kappa beta). O principal efeito resultante é a diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, TNF-α, IL-8, além de outras (SCUMPIA et al., 2005).

O MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos) atua sobre células T, monócitos, células NK, basófilos e mastócitos. Devido as suas propriedades quimiotáticas, estudos sugerem que esta quimiocina ativa células da linhagem monocítica, bem como poderia alterar o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias no modelo de endotoxemia letal (JIANG et al., 1992; ZISMAN et al., 1997). Vários achados mostram elevados níveis de MCP-1 no plasma de paciente com sepse (BOSSINK et al., 1995). A neutralização do MCP-1 resultou em um grande aumento da mortalidade em camundongos com endotoxemia letal, enquanto a administração da MCP-1 recombinante levou a um aumento acentuado da sobrevivência dos animais (ZISMAN et al., 1997). Para o modelo de sepse induzida por CLP, autores encontraram resultados semelhantes em que a neutralização do MCP-1 levou a aumento da mortalidade dos animais (MATSUKAWA et al., 1999)

2.8 Sepse e apoptose dos linfócitos

A apoptose, definida como a morte programada da célula, é um processo pelo qual a célula sofre um suicídio que não seja por via de necrose. Esta última ocorre na maioria das vezes por exposição a agentes nocivos, já a apoptose é dependente de genes específicos que iniciam um suicídio programado em resposta ao estímulo. O processo apoptótico é caracterizado por uma verdadeira deformação da célula em que ocorre encolhimento celular, rompimento da membrana e condensação da cromatina nuclear, devido a endonucleases endógenas (SCHWARTZ, OSBORNE, 1993; COHEN et al., 1992). A apoptose pode ser induzida por algumas substâncias tais como: glicocorticoides, citocinas pró-inflamatórias e o óxido nítrico. Pesquisas apontam que a

sepsis induz um aumento na taxa de apoptose em linfócitos imaturos residentes nos tecidos hematopoiéticos como medula óssea e timo (AYALA et al., 1995; AYALA et al., 1996).

A apoptose dos linfócitos tem sido reconhecida como um passo importante na patogênese da sepsis experimental, por induzir um estado chamado de “paralisia imunológica” que deixa o hospedeiro vulnerável aos patógenos invasores (LANG, MATUTE-BELLO, 2009). Weber et al., (2008) sugerem que a apoptose dos linfócitos é um dos fatores responsáveis pela modulação na sepsis e que tem sido reconhecida como um passo importante na patogênese da mesma. Autópsia realizada em pacientes que morreram com sepsis (entre 30 a 90 minutos após o óbito para evitar alterações celulares como autólise) revelou extensa apoptose dos linfócitos e das células gastrointestinais. A sepsis provavelmente acelera esse processo. Esses resultados foram semelhantes aos estudos com animais (HIRAMATSU et al., 1997; CHUNG et al., 1998; OBERHOLZER et al., 2001; HOTCHKISS et al., 1997; OBERHOLZER et al., 2001; COOPERSMITH et al., 2002).

Estudos feitos através da imuno-histoquímica do baço de pacientes autopsiados revelaram uma diminuição marcante no número de linfócitos B e T CD4⁺ bem como de células dendríticas. Entretanto, não houve alteração no número de macrófagos (HOTCHKISS et al., 2001; HOTCHKISS et al., 2002). A apoptose dos linfócitos aumenta rapidamente no sangue de pacientes com choque séptico, o que leva a uma linfopenia profunda e persistente e que o grau de apoptose dos linfócitos é diretamente proporcional à gravidade da sepsis (LE TULZO et al., 2002).

Há dois mecanismos principais pelos quais a apoptose contribui para a “paralisia imunológica na sepsis”. O primeiro se dá através da supressão das células efectoras, uma vez que a queda profunda nos linfócitos B e T prejudica a resposta imune adaptativa, que por sua vez interfere na resposta imune inata, devido a ligação que há entre esses dois tipos de imunidade. Ocorre ainda a diminuição das células dendríticas que é a mais importante apresentadora de antígeno. O segundo mecanismo decorre da anergia das células Th1 e Th2 (GRIFFITH et al., 1996; VOLL et al., 1997; FADOK et al., 1998).

2.8.1 Vias da apoptose na sepsis

Há dois caminhos clássicos envolvidos na indução da apoptose na sepsis (figura 5): via caspase-8 iniciada em um receptor específico (via extrínseca) e via caspase-9

iniciada na mitocôndria (via intrínseca) (MARSDEN, STRASSER, 2003). Tanto a caspase-8 quanto a caspase-9 têm a capacidade de ativar a caspase-3, que é uma protease crucial na via comum final da morte celular por apoptose. A caspase-8 pode ser ativada por ligantes de vários receptores, incluindo TNF- α e CD95L (ou FASL). A via mitocondrial pode ser ativada por uma gama de estímulos que incluem espécies reativas de oxigênio, agentes quimioterápicos e radiação. Estudos indicam que tanto a via extrínseca quanto a intrínseca estão envolvidas com a apoptose dos linfócitos. Hotchkiss et al., (1999a) mostraram que camundongos que superexpressam a proteína anti-apoptótica relacionada ao linfoma de células B tipo 2, (Bcl-2) que é uma proteína conhecida por proteger contra a apoptose mediada pela via mitocondrial, têm seus linfócitos quase que completamente protegidos da apoptose durante a sepse. Estudos de imuno-histoquímica do baço de pacientes que morreram com sepse mostram que houve apoptose dos linfócitos através da via mitocondrial (HOTCHKISS et al., 1999b; HOTCHKISS et al., 2001). Por outro lado, descobertas recentes mostram também que a via extrínseca é ativada uma vez que os linfócitos apoptóticos dos pacientes com sepse apresentavam tanto a caspase-8 ativa quanto a caspase-9 (HOTCHKISS et al., 2005).

Há outras possibilidades, pois pesquisas indicam que em alguns casos a caspase-3 ativada poderia ativar também a caspase-8. A própria caspase-3 poderia ser ativada pela caspase-9 em um verdadeiro circuito de amplificação. Outros estudos defendem que a caspase-3 pode ativar a caspase-9 de forma retrógrada. Desta forma, há uma verdadeira cascata de ativação entre estas caspases (CREAGH, MARTIN, 2001). Microscopia realizada nos tecidos esplênicos mostrou características morfológicas condizentes com apoptose, incluindo núcleo compactado e fragmentado (PERFETTINI, KROEMER, 2003; NEWTON, STRASSER, 2003; CREAGH, CONROY, MARTIN, 2003). É provável que vários fatores estejam envolvidos na determinação se a célula sofrerá apoptose e por que vai isto irá ocorrer. O estado da ativação, o estágio do ciclo celular, a magnitude do estímulo apoptótico e do tipo de bactéria podem estar envolvidos nesta decisão (HOTCHKISS, NICHOLSON, 2006). Pesquisa feita em modelo de sepse por *E. coli* em babuínos mostrou que a apoptose ocorreu tanto pela via extrínseca quanto pela via intrínseca (EFRON et al., 2004).

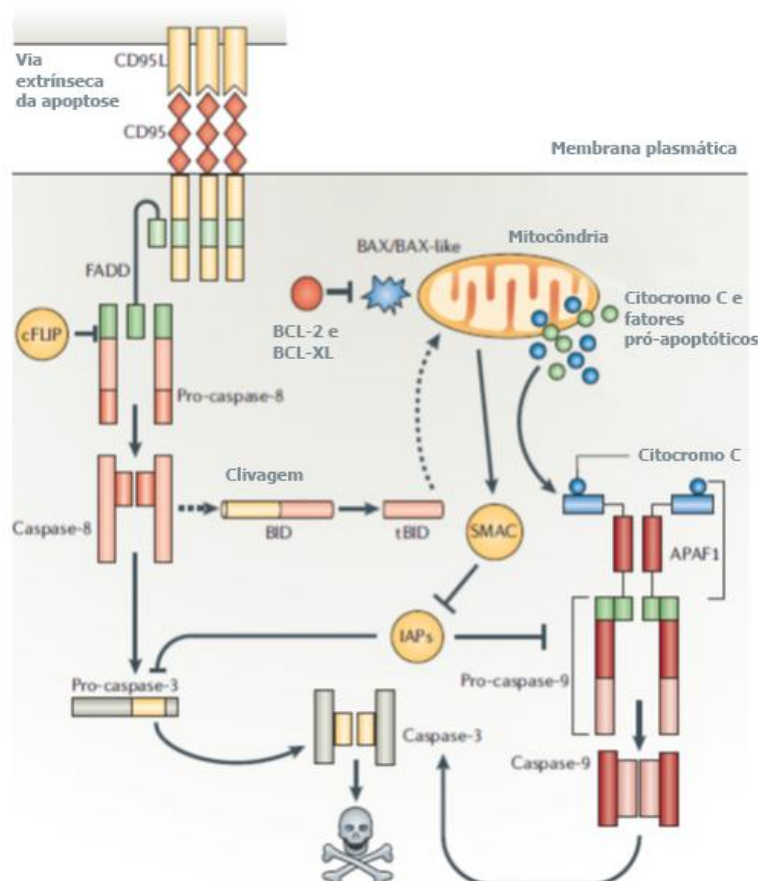


Figura 5: Comunicação entre as duas vias de morte celular por apoptose. A via extrínseca é mediada pela caspase-8 enquanto a via intrínseca é mediada pela caspase-9. BAX – Bcl-2 associada a proteína X; APAF-1 – fator ativador de protease apoptótica; SMAC – ativador de caspase secundário à mitocôndria; IAP – proteínas inibidoras de apoptose (fonte: HOTCHKISS, NICHOLSON, 2006)

2.9 Modelos experimentais de sepse

Reproduzir modelos animais de sepse implica em uma série de complicações uma vez que em humanos a doença apresenta bastante severidade, há necessidade de intervenções terapêuticas de forma imediata e também existe bastante heterogeneidade nos pacientes. O modelo utilizado deve causar vasodilatação, hipotensão, foco infeccioso, complicações imunológicas e até mesmo a mortalidade observada nos indivíduos acometidos. Estes modelos permitem um maior entendimento a respeito da fisiopatologia da doença. Novos alvos terapêuticos têm sido sugeridos, entretanto quando os resultados são extrapolados da pré-clínica para a clínica os resultados ainda são muitas vezes controversos (ZANOTTI-CAVAZZONI, GOLDFARB, 2009). Nos

seres humanos a sepse se desenvolve ao longo de horas ou dias e muitas vezes resulta de uma evolução clínica prolongada, o que pode ocasionar a falência múltipla de órgão e morte. Entretanto, os modelos animais geralmente resultam de uma situação clínica aguda e de curso pequeno, o que levanta as diferenças fisiopatológicas das duas diferentes circunstâncias (ZANOTTI-CAVAZZONI, GOLDFARB, 2009).

Os primeiros modelos de sepse utilizavam a administração de endotoxinas como o LPS por via intravenosa ou intraperitoneal. Esta técnica tem a grande vantagem pela facilidade do procedimento técnico e devido a sua resposta homogênea, tornando fácil a sua reprodução (BURAS, HOLZMANN, SITKOVSKY, 2005). A administração de LPS em animais ou humanos causa uma intensa liberação de mediadores pró-inflamatórios. Contudo, a maioria dos estudos clínicos utilizando resultados obtidos na sepse por endotoxemia falhou. A injeção de bactérias não leva à colonização e replicação essencial das mesmas para a reprodução de um foco infeccioso, e esta ausência mimetiza apenas a SIRS associada à sepse. Além disso, alterações cardiovasculares descritas em modelos de endotoxemia não são condizentes com o quadro observado em humanos (REMICK, WARD, 2005; BURAS, HOLZMANN, SITKOVSKY, 2005; CROSS, OPAL, SADOFF, 1993).

No modelo de administração exógena de patógenos viáveis como administração intravenosa ou intraperitoneal de *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* a investigação precisa do mecanismo de defesa do organismo contra o micro-organismo específico é possível. Diferentemente da endotoxemia, neste caso há a colonização e infecção bacteriana. Entretanto, assim como a endotoxemia, alguns fatores comprometem a eficácia do modelo, como a necessidade de quantificação bacteriana antes e depois da administração (BURAS, HOLZMANN, SITKOVSKY, 2005).

Tentando driblar os problemas intrincados com os modelos citados acima, modelos envolvendo peritonites foram desenvolvidos. Dentre eles o CLP foi amplamente difundido e é considerado pela maioria dos especialistas como o padrão ouro para mimetizar a sepse (DYSON, SINGER, 2009). A técnica do CLP estabelece uma infecção polimicrobiana, contendo bactérias aeróbias, anaeróbias e até mesmo fungos decorrentes do processo inflamatório e tecido necrosado. Esta técnica reproduz a infecção resultante em alterações hemodinâmicas e imunológicas condizentes com a sepse observada em pacientes humanos (DEITCH, 2005; WICHTERMAN, BAUE, CHAUDRY, 1980). São várias as aplicações para o modelo CLP, podendo ser utilizado para pesquisas de metabolismo e demanda energética (COOPERSMITH et al., 2002),

procedimento de ressuscitação (MARX et al., 2004), eficácia de antibióticos (RITTER et al., 2004), entre outras aplicabilidades. Alguns autores reconhecem as contribuições de tal modelo para a pesquisa da sepse, entretanto defendem que o CLP não reproduz completamente a severidade e complexidade da sepse em humanos, devendo ser investigadas de forma mais aprofundada as fases evolutivas da sepse (DEJAGER et al., 2011).

Sendo o modelo de indução de sepse letal mais utilizado por se assemelhar a progressão e características desta patogenia em humanos (DYSON, SINGER, 2009), este modelo foi o escolhido para efetuar este trabalho. Além disso, trata-se de uma pesquisa pioneira, pois até o presente momento não foram achados relato na literatura da avaliação da ação de *Z. mobilis* frente ao modelo de sepse por CLP em camundongos

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a imunomodulação mediada por *Zymomonas mobilis* UFPEDA 202 frente ao modelo de sepse induzido por ligadura e perfuração cecal (CLP).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sobrevivência dos animais submetidos a sepse após tratamento profilático, terapêutico ou uma combinação de ambos com *Zymomonas mobilis*;
- Avaliar a migração neutrofílica no lavado peritoneal dos animais submetidos à sepse por CLP;
- Investigar a concentração bacteriana no lavado peritoneal para os grupos pré-tratado com *Zymomonas mobilis* e controle;
- Determinar a concentração de mieloperoxidase no tecido pulmonar dos grupos controle e pré-tratado com *Zymomonas mobilis*;
- Determinar os níveis de citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 e a quimiocina MCP-1 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse por CLP;
- Avaliar alterações histopatológicas do ceco e pulmão nos grupos pré-tratado com *Zymomonas mobilis* e controle após sepse por CLP;
- Avaliar a apoptose dos linfócitos no baço dos animais submetidos à sepse.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para este trabalho foi utilizada a linhagem da bactéria *Zymomonas mobilis*, designada por CP4 e registrada como UFPEDA 202 pertencente à Coleção de Cultura de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

4.1 Pré-fermentação

Para obtenção da cultura de *Z. mobilis* foi realizada uma pré-fermentação em meio SSDL (Standard Swings e De Ley), cuja composição é: 20g/L de glicose e 5g/L de extrato de levedura (pH 6,5). O meio foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos. O inóculo foi incubado em estufa a 32°C durante 24 horas. A cultura derivada da pré-fermentação foi inoculada em meio de cultivo SSDL e incubada novamente em estufa a 32°C durante 24h, para obtenção do fermentado. Após este período, uma alíquota do fermentado foi plaqueada em placas de Petri contendo SSDL sólido e cultivada durante 48h em estufa a 32 °C. Após a incubação, a quantificação de células viáveis foi realizada através do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

4.2 Fermentação, quantificação das Unidades Formadoras de Colônias e teste de pureza

O meio foi preparado de forma idêntica ao meio da pré-fermentação e a fermentação iniciada pela transferência da cultura de pré-fermentação para o meio SSDL, numa proporção que representa 10% (v/v) do volume inicial de fermentação. A partir desta transferência foi iniciada a fermentação que durou 24 horas. Após esse tempo, uma alíquota de meio mililitro da cultura de *Z. mobilis* foi diluída de forma seriada e plaqueada sobre o meio SSDL. As placas semeadas foram incubadas durante 48 horas em temperatura de 32 °C. Após a incubação, a enumeração das células viáveis foi realizada e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) determinado. A cultura de *Z. mobilis* em meio SSDL foi semeada nos meios Sabouraud e Mueller-Hinton para detectar a possível contaminação de fungos e bactérias, respectivamente.

4.3 Animais

Para a realização do experimento de sepse induzida por CLP, foram utilizados camundongos machos albinos Swiss *Mus musculus*, pesando entre 25 e 30g (com cerca de 60 dias de nascidos), provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da

Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos sob temperatura de $22^{\circ}\text{C}\pm 2$, além de receberem água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais realizados seguiram os princípios técnicos e éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE sob processo de número 23076.015663/2011-10.

Foram utilizados cinco grupos, totalizando 64 animais distribuídos da seguinte forma:

A) G1 - controle L-CLP:(N=16) os animais receberam soro fisiológico (0,9%) v.o. duas vezes ao dia durante dez dias. No décimo primeiro foi induzida a sepse letal por CLP metade dos animais foi eutanasiada seis horas após a indução para observação dos parâmetros, enquanto a outra metade foi mantida para a observação da taxa de sobrevivência. Este grupo foi composto por dezesseis animais.

B) G2 - tratamento profilático com *Z. mobilis* para observação dos parâmetros e sobrevivência:(N=16) os animais foram previamente tratados com *Z. mobilis* (10^9 UFC) v.o. duas vezes ao dia durante dez dias. No décimo primeiro dia foi induzida a sepse letal por CLP e metade dos animais foi eutanasiada seis horas após a indução para observação dos parâmetros, enquanto a outra metade foi mantida para a observação da taxa de sobrevivência.

C) G3 - sham:(N=16) os animais receberam soro fisiológico (0,9%) v.o. duas vezes ao dia durante dez dias. No décimo primeiro uma parte dos animais sofreu uma incisão de 2 cm no abdômen, sem manipulação intestinal ou indução de sepse e foram suturados, sendo metade dos animais eutanasiados seis horas após o procedimento para a observação dos parâmetros. A outra metade foi mantida para observação da taxa de sobrevivência.

D) G4- sobrevivência tratamento curativo com *Z. mobilis*: (N=8) após indução da sepse por CLP os animais foram tratados com *Z. mobilis* (10^9 UFC) v.o. duas vezes ao dia durante 96 horas.

E) G5 – sobrevivência de tratamento profilático e curativo com *Z. mobilis*: (N=8) neste grupo houve uma combinação entre o tratamento profilático e curativo.

4.4 Indução da sepse letal por CLP

Os animais foram previamente anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de ketamina 80% e xilazina 8%. Após anestesia, foi realizada laparotomia mediana com exposição do ceco seguido de ligadura e 1 perfuração transversal do mesmo, com uma agulha 18G, para a indução da sepse letal. Após o procedimento cirúrgico, o ceco dos animais foi recolocado em sua posição original, dentro do abdômen, e o mesmo foi fechado em duas camadas com fio de sutura de nylon 4-0. Imediatamente após a cirurgia cada animal recebeu uma injeção subcutânea de um 1mL de salina a 37°C. Após seis horas da indução da sepse letal, grupos de animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e tiveram a cavidade peritoneal lavada com 3mL de PBS + EDTA (3mM) estéril, para determinação de leucócitos totais, citocinas e quantificação bacteriana. A metodologia descrita foi seguida de acordo com Rittirsch et al., (2009).

4.5 Contagem total e diferencial de leucócitos na cavidade peritoneal

O lavado peritoneal foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur e armazenado em tubos de ensaio para a quantificação do número de leucócitos totais. A contagem foi realizada em analisador hematológico ABX micros 60. Com auxílio de citocentrífuga SEROCITO[®] 2400 foram confeccionadas lâminas para a realização da contagem diferencial dos leucócitos. As lâminas foram coradas com May-Grünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

4.6 Determinação de citocinas no lavado peritoneal

Após a quantificação dos leucócitos, o lavado peritoneal foi centrifugado durante 10 minutos sob 2.000 rpm e o sobrenadante armazenado sob temperatura de -40°C para determinação das citocinas. As concentrações das citocinas TNF- α (sensibilidade 8 pg/mL e curva padrão 8-1000 pg/mL), IL-6 (sensibilidade 4 pg/mL e curva padrão 4-500 pg/mL), IL-10 (sensibilidade 30 pg/mL e curva padrão 30-4000 pg/mL) e MCP-1 (sensibilidade 15pg/mL e curva padrão 15-2000pg/mL) foram determinadas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience) e lidas em 450nm.

4.7 Enumeração das bactérias no lavado peritoneal

A quantificação do número de bactérias no lavado peritoneal foi realizada 6 horas após a indução da sepse. Os animais foram sacrificados, sendo a cavidade peritoneal lavada com PBS estéril. O lavado peritoneal foi então diluído (1:100; 1:1000; 1:10000) em PBS estéril e 10 µL dessa solução semeada em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories). Todo o procedimento foi feito sob condições estéreis. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 18h a 32°C e contado o número de colônias. Os resultados foram expressos como Log de UFC/mL para o lavado peritoneal.

4.8 Avaliação histopatológica

Para avaliar a migração neutrofílica para a parede do ceco e pulmão dos camundongos submetidos à sepse, animais de cada grupo (sham, controle, e pré-tratado com *Zymomonas mobilis*) foram sacrificados 6 horas após indução da sepse por CLP. Fragmentos do ceco e pulmão foram removidos, fixados em formol 10% por 24 h, desidratados em álcool e embebidos em parafina. Fragmentos de 5µm foram corados em Hematoxilina – Eosina para análise histopatológica da resposta inflamatória.

4.9 Avaliação da apoptose dos linfócitos no baço

Para avaliar a apoptose dos linfócitos no baço dos camundongos submetidos à sepse, animais de cada grupo (sham, controle, e pré-tratado com *Zymomonas mobilis*) foram sacrificados 6 horas após indução da sepse por CLP. Fragmentos do baço foram removidos e fixados com glutaraldeído 2,5% (Sigma) e paraformaldeído a 4% (Sigma) em 0,1M de tampão cacodilato de sódio (Sigma). Após a fixação, as amostras foram lavadas duas vezes no mesmo tampão e pós-fixados em 0,1M tampão cacodilato (pH 7,2) contendo 2% de tetróxido de ósmio (Sigma), 5mM de cloreto de cálcio e 0,8% de ferrocianeto de potássio. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes com o uso de acetona e incluídas em SPIN PON-resina (Embed 812). Os blocos foram polimerizados e armazenados em estufa à 60°C por três dias. Cortes semifinos foram coletados e armazenados em grades de níquel, contrastando com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de

transmissão (Morgani FEI 268D). Um mínimo de 100 células por amostra foram observadas para avaliar alterações morfológicas celulares, sendo o percentual de células apoptóticas expressas.

4.10 Quantificação de mieloperoxidase

Amostras do tecido pulmonar foram coletadas em solução tampão (fosfato monobásico e dibásico) acrescentadas de HTAB (hexadecil trimetil brometo de amônio) e trituradas com auxílio do polytron 1X. Completou-se o volume da solução para uma concentração de 50mg/mL. Centrifugou-se durante 5 min a 6.000 rpm. Adicionou-se 200µL de solução de meio tampão (0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H₂O₂) em cada poço. Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 µL de azida sódica (1%) em cada poço. As soluções foram lidas em placas de ELISA a 540nm. Curvas-padrão com concentrações conhecidas da mieloperoxidase (0,7-140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos.

4.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 5, 6 ou 8 animais/grupo. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad versão 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Utilizou-se Análise de Variância ANOVA One-way seguido do teste de Bonferroni, com nível de significância de 0,05%. A sobrevida dos camundongos foi demonstrada usando a curva de Mentel-Cox e o teste de log-rank foi aplicado para comparar as curvas. O teste T foi usado para comparação dos dados obtidos para a enumeração bacteriana no lavado peritoneal, com nível de significância de 0,05%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da sobrevida

Com intuito de avaliar a ação de *Z. mobilis* na sobrevida dos animais submetidos à sepse grave, foi realizado o modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP). Esta sobrevida foi acompanhada a cada 12 horas após a cirurgia durante um período de 96 horas. Os animais submetidos a um pré-tratamento com *Z. mobilis* por 10 dias apresentaram uma taxa de sobrevida de 100% nas 12 primeiras horas, enquanto o grupo controle obteve uma sobrevivência de 50% neste mesmo período (Figura 6). Após 36 horas todos os animais do grupo controle vieram a óbito, isto caracterizou uma sepse severa (ALVES-FILHO et al., 2008). Entretanto o grupo submetido ao pré-tratamento com a *Z. mobilis* ainda apresentava uma taxa de sobrevivência de 60% neste mesmo período. Após as 96 horas de observação, o grupo pré-tratado apresentou uma sobrevida de 37,5%. Estes dados supõem um papel profilático de *Z. mobilis* frente a sepse induzida por CLP em camundongos.

Cadirci et al., (2010) investigaram a ação do ácido alfa-lipólico (composto com propriedades anti-oxidantes) e encontraram uma taxa de sobrevida de 70% para o grupo teste nas 12 primeiras horas após indução da sepse contra 40% do grupo controle. Ao investigarem a ação de um análogo da curcumina, o BHMC, Tham et al., (2011) encontraram uma taxa de sobrevida de 80% após 12 horas para o grupo tratado e controle.

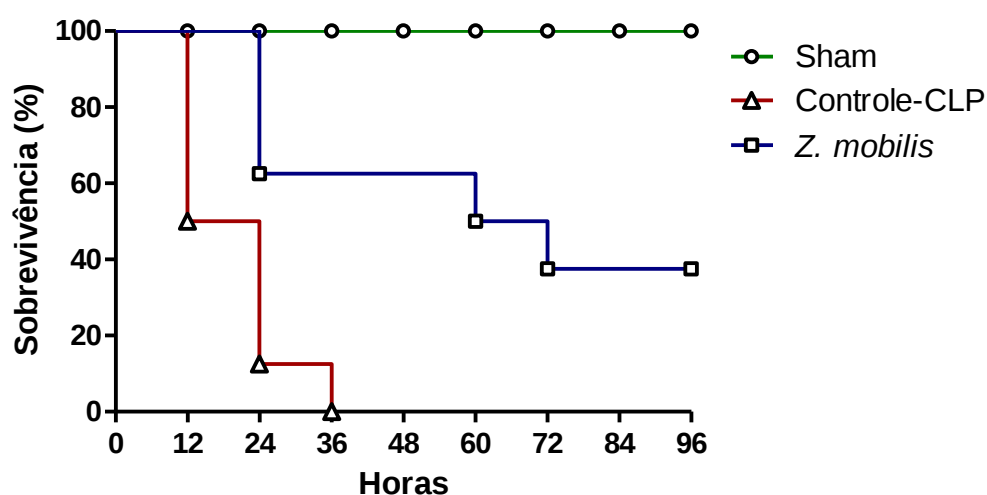


Figura 6: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* na taxa de sobrevida de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A taxa de sobrevida foi observada a cada 12 horas durante 96 horas e expressa em

porcentagem dos animais ($n = 8$). Os grupos são estatisticamente diferentes com $P \leq 0,0004$ pelo teste de Mantel-Cox.

Visando avaliarmos se além do papel profilático, a administração de *Z. mobilis* associada a este pré-tratamento desempenharia um papel terapêutico, acompanhamos a sobrevida dos animais submetidos à CLP em um grupo denominado pré-pós tratado. Nas 24 primeiras horas após cirurgia, o grupo controle apresentou uma taxa de sobrevida de apenas 12,5% enquanto o grupo teste exibiu uma sobrevida de 100%. Após 60 horas de experimento, o grupo teste com *Z. mobilis* apresentou um índice de sobrevivência de 50% e este se manteve até às 96 horas observadas, enquanto o grupo controle já havia apresentado 100% de mortalidade após 36 horas de cirurgia (Figura 7).

David et al., (2011) avaliaram a ação da administração da angiopoetina-1 (um fator angiogênico essencial para o desenvolvimento vascular) em camundongos submetidos a sepse grave e encontraram um percentual de sobrevida de 20% nas 24 horas iniciais pós-cirurgia, tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratado.

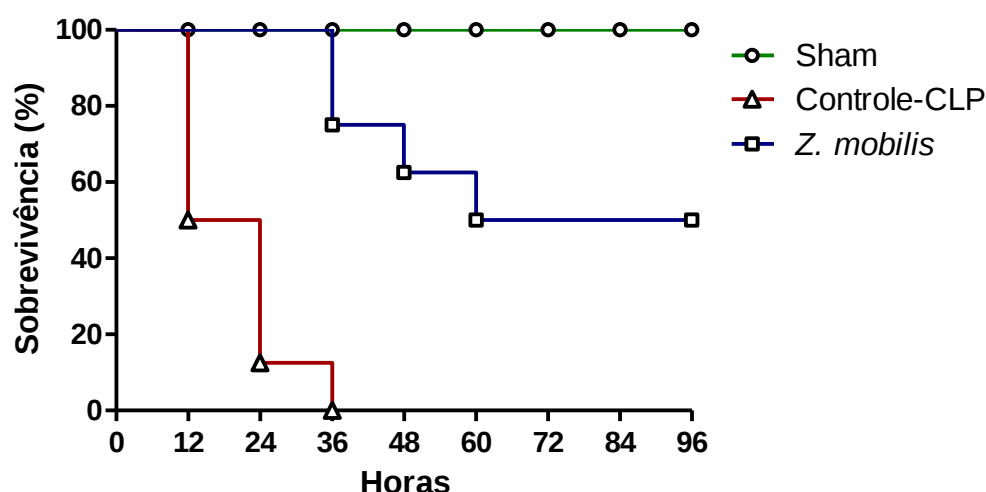


Figura 7: Efeito do pré-pós-tratamento de *Z. mobilis* na taxa de sobrevida de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A taxa de sobrevida foi observada a cada 12 horas durante 96 horas e expressa em porcentagem dos animais ($n = 8$). Os grupos são estatisticamente diferentes com $P \leq 0,0001$ pelo teste de Mantel-Cox.

Adrian et al., (2009) investigaram a ação do SN-50 (inibidor do NFκ-B) e do SB-202190 (inibidor do P38 MAPK) e encontraram uma taxa de sobrevida de 37,5% para o primeiro composto e de 60% para o segundo composto após 80 horas de cirurgia. A administração ocorreu 2 horas antes da cirurgia. Bao e Li (2011) concluíram que o pré-tratamento com propofol (anestésico intravenoso com possível ação anti-

inflamatória) induziu a uma sobrevida de 60% versus 20% do controle após 40 horas de cirurgia. O pós-tratamento com o mesmo fármaco ocasionou um aumento para 70% na taxa de sobrevivência.

Beffa et al., (2011) avaliaram o efeito do pré-tratamento da sinvastatina (fármaco inibidor da enzima HMG-CoA redutase utilizado para dislipidemia) em camundongos submetidos a queimadura mais CLP e encontraram uma taxa de sobrevida de cerca de 40% para o grupo tratado após 96 horas de experimento.

Para investigar se a ação benéfica de *Z. mobilis* estava na sua atuação profilática, curativa ou uma associação entre os dois tratamentos, testamos um grupo tratado após a indução da sepse (Figura 8). Entretanto, diferentemente dos dois grupos anteriores, houve uma piora na resposta equiparando-se ao grupo controle, pois após 24 horas de cirurgia o grupo teste assim como o controle apresentava uma taxa de sobrevivência de 12,5%, permanecendo este percentual para o grupo teste até às 96 horas.

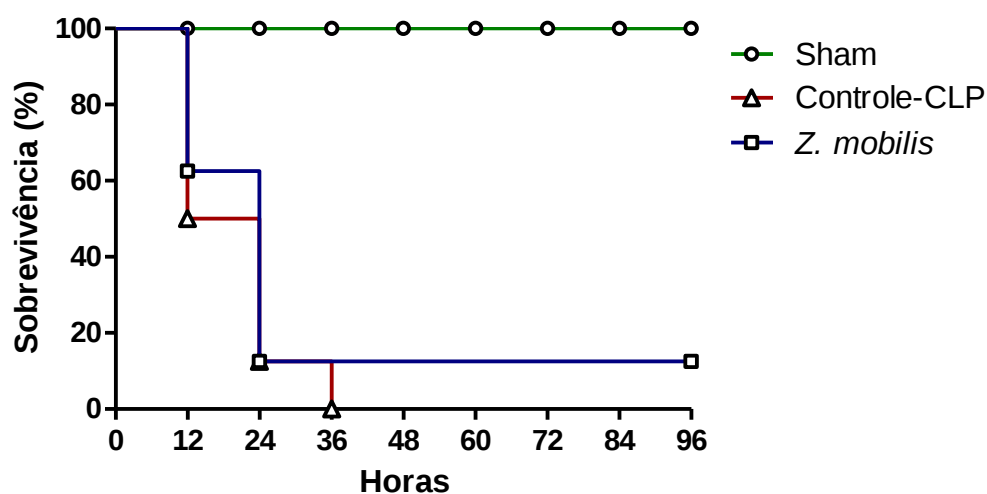


Figura 8: Efeito do pós-tratamento de *Z. mobilis* na taxa de sobrevida de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A taxa de sobrevida foi observada a cada 12 horas durante 96 horas e expressa em porcentagem dos animais ($n = 8$). Os grupos são estatisticamente diferentes com $P \leq 0,0046$ pelo teste de Mantel-Cox.

Maciel et al., (2008) investigaram a administração de *Syzygium jambolanun* - Jambolão (planta utilizada popularmente por suas propriedades hipoglicemiantes) após a indução da sepse e concluíram uma sobrevida de 50% contra 20% do controle após 96 horas. Entretanto, o tratamento profilático havia provocado uma sobrevida de 100%.

Nossos achados corroboram com os dados de vários autores que descrevem a ação profilática dos micro-organismos com ação imunomoduladora, mas raramente sua ação terapêutica após patologia instalada. Este fato pode ser possivelmente explicado pela ação colonizadora e atuante no sistema imune que a maioria desses micro-organismos exerce sobre o trato gastrointestinal e para que isto ocorra, o micro-organismo deve ser administrado previamente (BESSELINK et al., 2004; SARTOR, 2005; KOPP-HOOLIH, 2001; SULLIVAN, NORD, 2002; ALVAREZ-OLMOS, OBERHELMAN, 2001). Após indução da sepse grave, os animais começaram a apresentar falência múltipla dos órgãos, resultando em mortalidade de 100% após 36 horas de cirurgia para o grupo controle. A bactéria *Z. mobilis* é Gram-negativa e anaeróbia facultativa (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2008), o que torna conveniente sua colonização no trato gastrointestinal, promovendo uma ação protetora na mucosa intestinal.

5.2 Avaliação do recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso

Animais previamente tratados com *Z. mobilis*, bem como o grupo controle foram submetidos à sepse por CLP e após 6 horas foram eutanasiados para a observação do recrutamento de neutrófilos para o foco da infecção. Para o grupo sham não houve indução da sepse, entretanto sua migração de neutrófilos também foi avaliada após 6 horas do procedimento.

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o foco infeccioso, desta forma eles são responsáveis pela fagocitose dos micro-organismos invasores. Posteriormente, o material fagocitado é eliminado por enzimas lisossomais e radicais livres de oxigênio e nitrogênio produzidos por estas células do sistema imune (HAMPTON et al., 1998). Desta forma, foi avaliado o percentual de migração dos neutrófilos para foco infeccioso (Figura 9) e uma falha na migração neutrofílica pode ser observada para o grupo controle. Em contraste, o grupo tratado com *Z. mobilis* apresentou um grande aumento na migração.

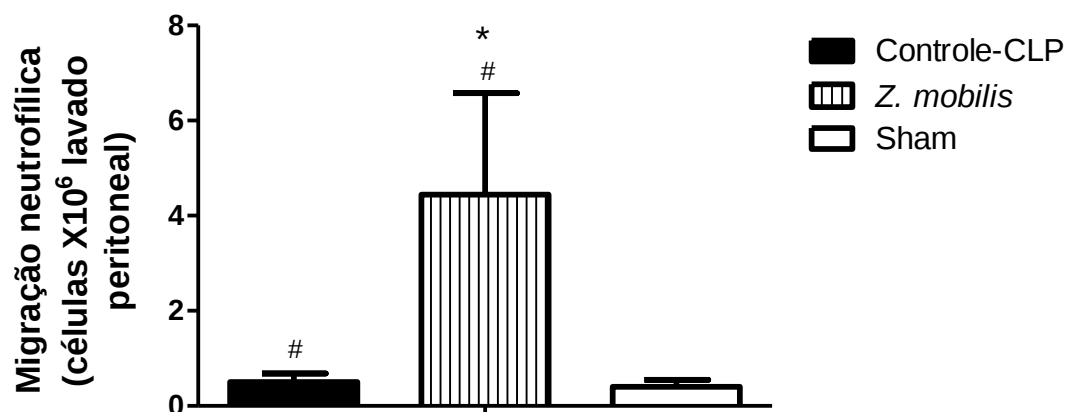


Figura 9: efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* na migração neutrofílica no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP. O número de neutrófilos na cavidade peritoneal foi avaliado após 6 horas da indução da sepse nos animais ($n = 5$). Resultados expressos como média $\pm$ DP. # $P \leq 0,05$ quando comparados com o grupo sham. * $P \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle pelo teste de Bonferroni.

A falência na migração de neutrófilos tem sido relatada em diversos modelos de sepse tais como: endotoxemia (TAVARES-MURTA et al., 1998), sepse por bactéria gram-negativa (CARVALHO et al., 2005, ALVES-FILHO et al., 2006), sepse por bactéria gram-positiva (CROSARA-ALBERTO et al., 2002), CLP em ratos (TORRES-DUEÑAS et al., 2006) e CLP em camundongos (BENJAMIM et al., 2000). Os autores desses trabalhos associaram a elevada taxa de mortalidade ao prejuízo na migração de neutrófilos.

Estudos realizados por Duenas (2006), Torres-duenas et al., (2006), Benjamim et al., (2000) e Maciel et al., (2008) confirmam que a disfunção da migração neutrofílica em direção ao foco infeccioso, em animais submetidos à sepse severa, está associada a um grande déficit no controle da infecção, o que levou a uma maior disseminação sistêmica das bactérias assim como induziu um alta taxa de mortalidade.

O mecanismo relacionado à falha da migração de neutrófilos ainda não foi totalmente elucidado, entretanto acredita-se que ocorre em função da grande liberação de citocinas pró-inflamatórias associadas a aumento do óxido nítrico derivado de sua isoforma induzida da óxido nítrico sintase (TAVARES-MURTA et al., 1998).

O papel dos neutrófilos durante o processo infeccioso é bem evidenciado em patologias ou tratamentos em que ocorre diminuição abrupta na quantidade destas células. Como exemplo tem-se a depleção neutrofílica decorrente de tratamentos com

quimioterápicos, associado firmemente a infecções fúngicas e bacterianas. Através da transfusão de frações sanguíneas o nível de neutrófilos aumentou, corrigindo esta maior susceptibilidade a infecção (FAURSCHOU, BORREGAARD, 2003; KONG et al., 2005).

5.3 Contagem bacteriana no lavado peritoneal

Seis horas após a indução da sepse polimicrobiana pela CLP foi quantificado o número de bactérias presentes no lavado peritoneal (Figura 10). A quantificação de bactérias no foco infeccioso foi significativamente maior no grupo controle do que no grupo tratado com *Z. mobilis*.

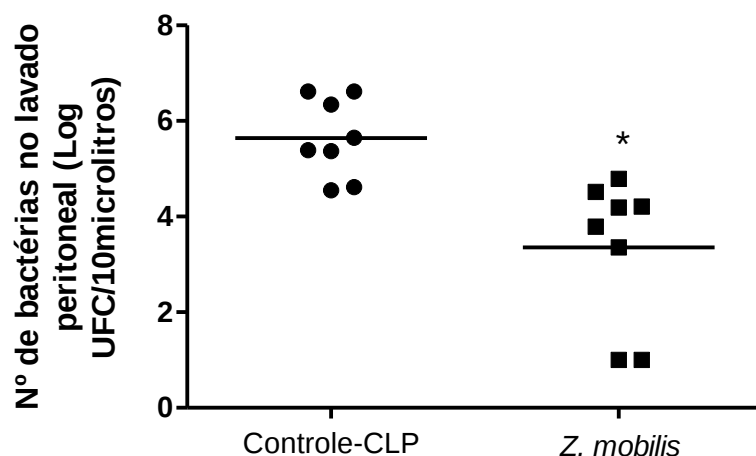


Figura 10: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* na quantificação bacteriana no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A quantificação bacteriana na cavidade peritoneal foi avaliada 6 horas após indução da sepse nos animais ($n = 8$). Resultados expressos como média $\pm$ DP. * $P \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle pelo teste T

Mesquita (2008) observou a ação antagonista de *Z. mobilis* frente às culturas de *E. coli* ATCC 8739 e *E. coli* O157:H7 e constatou que era dependente da concentração de inóculo utilizada. Estudos *in vivo* a respeito da ação antagonista de *Z. mobilis* frente a micro-organismos patogênicos durante a sepse polimicrobiana são ainda desconhecidos. Entretanto, os dados deste estudo corroboram com os achados da autora citada anteriormente a respeito da atividade antimicrobiana da bactéria não patogênica testada.

A eficiente migração de neutrófilos observada 6 horas após a indução da sepse grave no grupo pré-tratado, possivelmente promoveu um melhor controle do foco infeccioso, como foi mostrado pela redução das UFC no lavado peritoneal.

Os dados corroboram com os de outros autores em que o aumento da migração de neutrófilos ocorreu concomitantemente com a diminuição da presença bacteriana no foco da infecção (BENJAMIN et al., 2002; CROSARA-ALBERTO et al., 2002). Alves-filho et al., (2008) observaram que animais nocaute para o receptor *Toll-like 2* apresentavam maior taxa de migração bem como diminuição nas UFC presentes no lavado peritoneal. Alves-filho et al., (2010) concluíram que a administração de IL-33 induziu resultados semelhantes.

5.4 Dosagem de mieloperoxidase no tecido pulmonar

Seis horas após a indução da sepse por CLP os animais do grupo controle e pré-tratado com *Z. mobilis* tiveram amostras do tecido pulmonar armazenadas para quantificação da mieloperoxidase (MPO). O grupo controle apresentou uma concentração de $598,5 \pm 78,8$ U/mg de MPO. Em contrapartida, o grupo tratado com *Z. mobilis* apresentou uma concentração de $433 \pm 23,2$ U/mg representando uma diminuição significativa nos níveis enzima com relação ao grupo controle. O grupo sham apresentou concentração de $307 \pm 23,6$ U/mg para a MPO (Figura 11).

A atividade máxima da MPO nos pulmões é encontrada após seis horas da sepse por CLP (SPEYER et al., 2004). Os neutrófilos têm sido apontados como células mediadoras da lesão aguda no pulmão e relacionados à síndrome do estresse respiratório agudo, situações constantemente presentes na sepse. Portanto, a quantidade de neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliada pelo método da atividade da mieloperoxidase. A MPO é uma enzima proveniente de leucócitos que é responsável pela catálise de várias espécies reativas oxidantes. Além de participarem da resposta imune inata, evidências comprovam a contribuição desses oxidantes para o dano tecidual durante o processo inflamatório (ROMAN, WENDLAND, POLANCZYK, 2007).

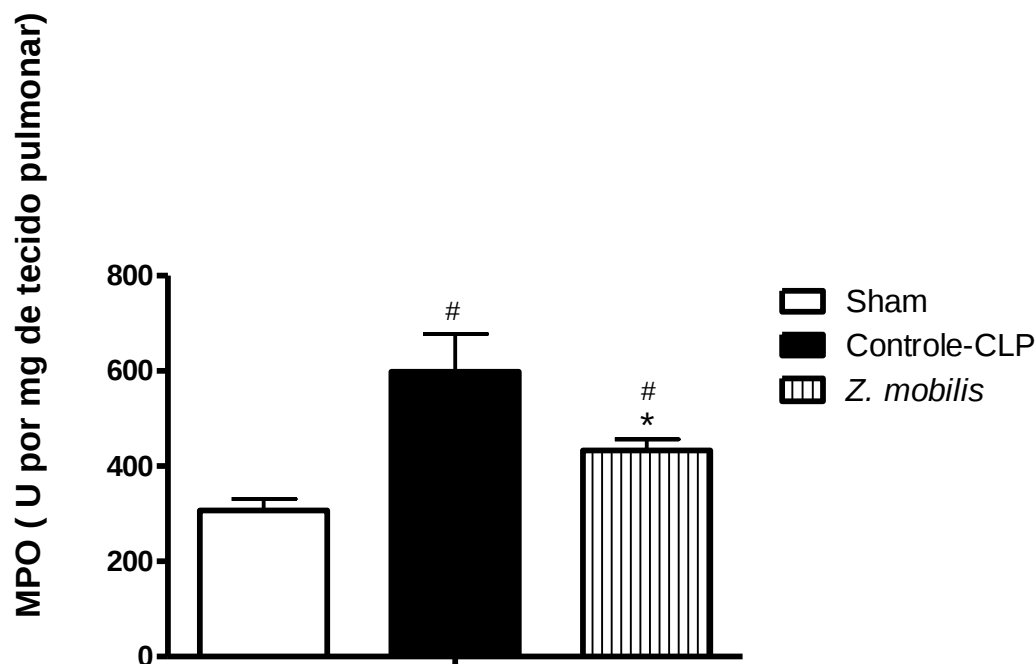


Figura 11: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* na expressão de MPO no tecido pulmonar de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A expressão de MPO no tecido pulmonar foi avaliada após 6 horas da indução da sepse nos animais ($n = 6$). Resultados expressos como média $\pm$ DP. # $P \leq 0,05$ quando comparados com o grupo sham. * $P \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle pelo teste de Bonferroni.

Torres-Deñás et al., (2007) avaliaram a ação do ácido úrico, um inibido do peroxinitrito envolvido com a inibição do NO sobre a migração de neutrófilos na sepse, e demonstraram que este composto causou uma melhora na resposta inflamatória sistêmica através da redução das citocinas circulantes e da diminuição do grau de infiltração dos neutrófilos no tecido pulmonar. Estudo realizado com ratos *Gai2(-/-)*, uma proteína sinalizada pelos receptores *Toll-like* envolvida com a resposta anti-inflamatória durante a sepse, mostrou que estes animais tiveram a taxa de sobrevivência reduzida significativamente e um grande aumento da atividade da MPO no tecido pulmonar com relação aos animais selvagens (FAN et al., 2011).

Gosemann et al., (2010) investigaram animais C3H/HeJ (mutantes para TLR 4) submetidos à sepse por CLP e observaram um aumento do influxo de neutrófilos nos pulmões dos animais selvagens através dos níveis de MPO com relação aos animais mutantes. He et al (2009) estudaram a ação da fractalcina (FTK), uma quimiocina que se liga à membrana como uma molécula de adesão na sepse, e perceberam que a injeção desta quimiocina antes da indução da sepse por CLP nos animais reduziu a lesão

pulmonar pela diminuição da concentração da MPO com relação ao grupo controle, corroborando com os achados histopatológicos.

O papel do cloreto de metileno, fonte de monóxido de carbono tido como auxiliar na resolução da inflamação pulmonar aguda, foi avaliado na sepse por CLP em ratos e constatou-se que houve redução nos níveis de MPO no tecido pulmonar dos animais tratados com relação ao grupo controle além da melhora na taxa de sobrevivência. Estes dados foram confirmados pelos achados histopatológicos e pela contagem celular. Além disso, houve grande aumento de IL-10 e redução nos níveis de TNF- α (PANG et al., 2010). Da forma semelhante, Cardici et al., (2010) investigaram a lesão pulmonar aguda, uma das principais complicações durante o choque séptico letal, através da proteção desta lesão pela administração do ácido α -lipólico (possui propriedades antioxidantes) em animais. Perceberam que a administração deste composto diminuiu o estresse oxidativo e reduziu o acúmulo de neutrófilos no pulmão através dos níveis de MPO, com relação ao grupo controle.

A redução dos níveis de MPO no tecido pulmonar dos animais pré-tratados com *Z. mobilis* demonstrou que esta bactéria pode atuar na redução dos danos oxidativos na lesão pulmonar aguda durante a sepse pela redução do infiltrado neutrofílico no pulmão. Estes achados corroboram com os de autores citados anteriormente em que a melhora na sobrevivência foi acompanhada pela redução da concentração do MPO no tecido pulmonar.

5.5 Dosagem das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 e da quimiocina MCP-1 no lavado peritoneal

O TNF- α é um dos mediadores responsáveis pela disfunção orgânica e aumento da letalidade durante a sepse grave (GAUR, AGGARWAL, 2003; GORDON et al., 2004; LEON et al., 1998; CUNHA, 2010). Desta forma, foi avaliada a presença desta citocina no lavado peritoneal dos animais submetidos à CLP e sham. O grupo controle apresentou uma concentração de $112,9 \pm 7,3$ pg/mL de TNF- α . Em contrapartida, o grupo tratado com *Z. mobilis* apresentou uma concentração de $85,3 \pm 14,4$ pg/mL representando uma diminuição nos níveis desta citocina com relação ao grupo controle. O grupo sham apresentou concentração de $23,3 \pm 3,5$ pg/mL para o TNF- α (Figura 12).

A produção de citocinas e quimiocinas no foco da lesão infecciosa permite o recrutamento de diversas células do sistema imune para a reparação e cicatrização do tecido injuriado. Entretanto, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e supressão das anti-inflamatórias pode induzir a um detrimento do número de neutrófilos

recrutados para o sítio da lesão (TAVARES-MURTA et al., 1998). Desta forma, avaliamos a concentração das citocinas intimamente ligadas ao desenvolvimento e evolução da sepse severa.

A resposta inflamatória sistêmica é considerada como um evento maléfico central na fisiopatologia da sepse. Níveis altos de citocinas na circulação estão envolvidos na disfunção múltipla de órgãos (WALLEY et al., 1996; HOTCHKISS, KARL, 2003). O descontrole do foco infeccioso inicial leva à disseminação da infecção com exacerbada produção de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais e leucócitos na corrente sanguínea. (VAN ZEE et al., 1991; GLAUSER et al., 1994; SANDS et al., 1997).

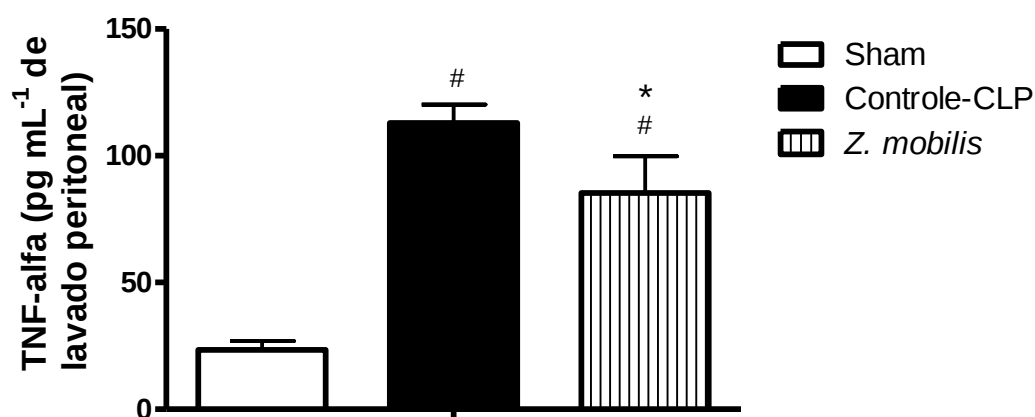


Figura 12: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* na expressão de TNF- α no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A expressão de TNF- α na cavidade peritoneal foi avaliada após 6 horas da indução da sepse nos animais ($n = 6$). Resultados expressos como média $\pm$ DP. # $P \leq 0,05$ quando comparados com o grupo sham. * $P \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle pelo teste de Bonferroni.

Os achados corroboram com os dados encontrados por Ma et al., (2006) e Maciel et al., (2008) em que o aumento da taxa de sobrevida foi acompanhado pela diminuição nos níveis de TNF- α para o grupo tratado com *Syzygium jambolanum* Liu-Shen-Wan (fórmula chinesa que inclui compostos de origem animal e mineral) respectivamente, em relação ao grupo controle. Alves-Filho et al., (2010) obtiveram uma redução nos níveis de TNF- α no soro do grupo tratado com IL-33 6 horas após o experimento. Entretanto, para o lavado peritoneal não houve diferença entre os grupos teste e controle.

Os trabalhos descritos na literatura trazem a dosagem do TNF- α em diferentes períodos após a CLP. Remick et al., (2000) observaram que a concentração desta citocina é crescente quando medida a partir do lavado peritoneal, pois entre 0 e 8 horas após indução da sepse esta última hora apresentou um pico. Cao et al., (2010) dosaram TNF- α no tecido intestinal e corroborando com os achados de Remick et al., (2000) encontraram um pico na concentração desta citocina após 8 horas da indução da sepse. Os autores defendem que o excesso desta citocina pode induzir a um aumento no recrutamento de leucócitos, incremento da permeabilidade vascular, pode ainda causar distúrbios coagulatórios sistêmicos e mudanças no metabolismo das células.

Maier et al., (2004) visando a caracterização da inflamação sistêmica durante a sepse, dosaram TNF- α nos períodos de 6, 12 e 18 horas após a cirurgia e observaram produção desta citocina em todos os tempos observados.

Chen et al., (2005) demonstraram um aumento na concentração de TGF- β e IL-10 acompanhado de diminuição nos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-12 em camundongos inoculados com *Lactobacillus acidophilus*, uma cepa probiótica e imunomoduladora. Esses dados corroboram com os nossos achados para *Z. mobilis* em que houve diminuição no nível de TNF- α . Foligne et al., (2007) observaram redução estatisticamente significativa na expressão do gene (TNF- α) através da administração intragástrica de *L.lactis* em animais quando comparado ao grupo controle.

Outra importante citocina envolvida com a patogênese da sepse é a IL-6. Riedemann et al., (2006) demonstraram que a inibição da IL-6 pode aumentar a taxa de sobrevivência em camundongos submetidos a CLP. Todavia, Vyas et al., (2005) não conseguiram reproduzir tais resultados. O grupo controle apresentou uma concentração de $340,3 \pm 11,4$ pg/mL de IL-6. Em contrapartida, o grupo tratado com *Z. mobilis* apresentou uma concentração de $410,7 \pm 12,2$ pg/mL demonstrando um aumento nos níveis desta citocina com relação ao grupo controle. O grupo sham apresentou concentração de $156,2 \pm 27,8$ pg/mL para a IL-6 (Figura 13).

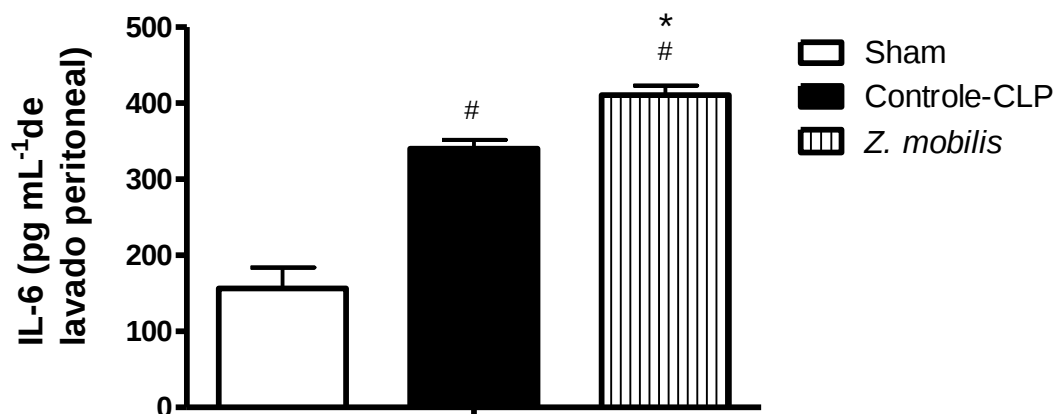


Figura 13: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* na expressão de IL-6 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A expressão de IL-6 na cavidade peritoneal foi avaliada após 6 horas da indução da sepse nos animais ($n = 6$). Resultados expressos como média $\pm$ DP. # $P \leq 0,05$ quando comparados com o grupo sham. * $P \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle pelo teste de Bonferroni.

A IL-6 é produzida pelos adipócitos e por células do sistema imune, reduzindo a produção de outras citocinas inflamatórias e estimulando a secreção de proteínas de fase aguda no fígado, participando desta forma do controle da inflamação (TORPY et al., 1998).

Damas et al., (1991) investigaram os níveis de IL-6 no soro de pacientes com choque séptico e concluíram que há uma correlação entre o pico de IL-6 e de TNF- α no soro destes pacientes. Os autores perceberam que níveis acima de 1000pg/mL no soro induzia um aumento na taxa de mortalidade, descrevendo esta citocina como um bom marcador para a severidade na sepse infecciosa. Corroborando com esses achados, Bont et al., (1994) mitigaram os níveis de TNF- α e IL-6 relacionados a neonatos com suspeita de acometimento septicêmico e concluíram um índice de confiabilidade de 73% para a primeira citocina e de 80% para a segunda, defendendo que a combinação destas duas é um bom fator preditivo para confirmação de diagnóstico de sepse neonatal.

Quimiocinas são mediadores inflamatórios conhecidos por desempenhar um importante papel na patogênese da sepse e endotoxemia. A proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) é um mediador quimioatraente potente relacionado a uma grande variedade de patologias inflamatórias (RAMNATH et al., 2008). Desta maneira, foi investigado o perfil desta quimiocina no lavado peritoneal dos animais submetidos a

CLP e o sham. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa nos níveis de MCP-1 no grupo pré-tratado com *Z. mobilis* em relação ao grupo controle.

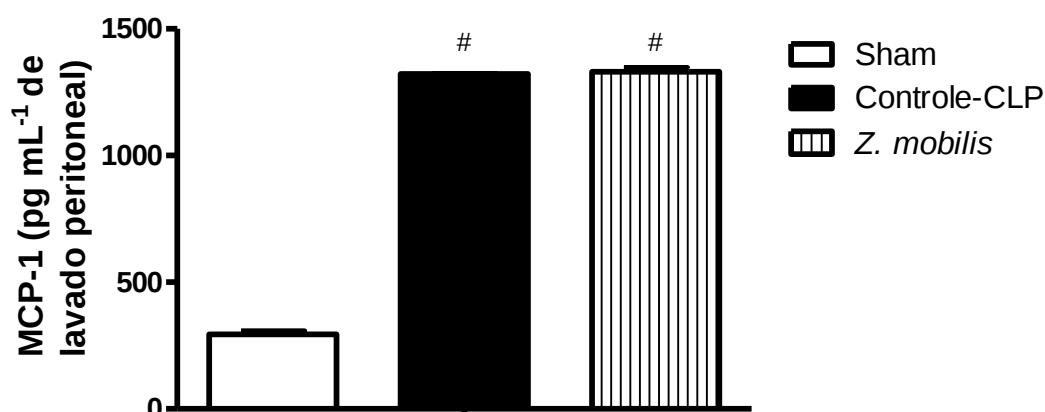


Figura 14: efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* na expressão de MCP-1 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A expressão de MCP-1 na cavidade peritoneal foi avaliada após 6 horas da indução da sepse nos animais ($n = 6$). Resultados expressos como média $\pm$ DP. # $P \leq 0,05$ quando comparados com o grupo sham pelo teste de Bonferroni.

Ramnath et al., (2008) utilizaram um bloqueador da síntese do MCP-1, o bindarit, percebendo que o tratamento reduziu a injúria no fígado e nos pulmões pela diminuição do espessamento alveolar e infiltrado de neutrófilos no modelo de CLP induzindo sepse e LPS induzindo endotoxemia.

O MCP-1 é responsável pela atração de monócitos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e células *Natural Killer* (VERMONT et al., 2006). É sintetizado por células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais, músculo liso constitutivamente ou após estresse oxidativo. Em animais sépticos o MCP-1 exerceu função moduladora sobre a resposta inflamatória, relacionado à redução dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6 e KC (quimiocina derivada de queratinócitos), além de aumento nos níveis de IL-10 (24 horas após a cirurgia) (GOMES et al., 2006, MATSUKAWA et al., 1999). No nosso estudo provavelmente não há a participação do MCP-1, podendo haver para outras quimiocinas não testadas.

Apesar de estudada por diversos pesquisadores, o papel da IL-10 na sepse ainda é citado por muitos deles como obscuro, entretanto a maioria concorda que exerce função determinante para sua fisiopatologia (BAGBY et al., 1991; SENA, 2005). Desta maneira, foram investigados os níveis desta citocina no lavado peritoneal dos animais

expostos a CLP e no grupo sham. O grupo controle apresentou uma concentração de $1837,41 \pm 173,8$ pg/mL de IL-10. Em contrapartida, o grupo tratado com *Z. mobilis* apresentou uma concentração de $3047,4 \pm 123,45$ pg/mL demonstrando um aumento nos níveis desta citocina anti-inflamatória e imunorreguladora com relação ao grupo controle. O grupo sham apresentou concentração de $141,3 \pm 33,9$ pg/mL para a IL-10 (Figura 15).

A IL-10 é uma citocina responsável por uma vasta habilidade imunorregulatória, atuando tanto sobre o sistema imune inato quanto no sistema imune adaptativo (LINDSAY, HODSON, 2001). Esta atividade imunomoduladora é baseada na sua capacidade de inibir tanto a síntese de quimiocinas, como a produção de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo recrutamento de células de forma exacerbada podendo induzir a uma síndrome inflamatória sistêmica, como ocorre na sepse (MOORE et al., 2001).

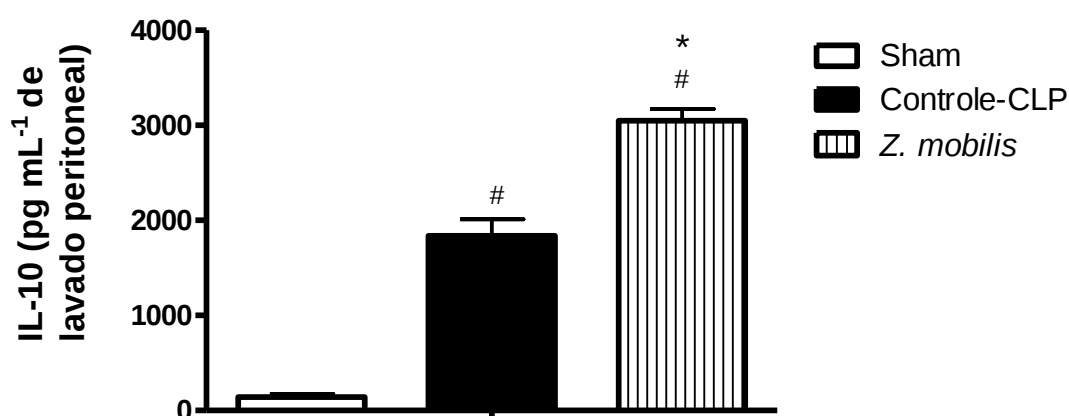


Figura 15: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* na expressão de IL-10 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A expressão de IL-10 na cavidade peritoneal foi avaliada após 6 horas da indução da sepse nos animais ($n = 6$). Resultados expressos como média $\pm$ DP. # $P \leq 0,05$ quando comparados com o grupo sham. * $P \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle pelo teste de Bonferroni.

Apesar da maioria dos seus efeitos inibitórios em linfócitos T serem concomitantes à redução de citocinas pró-inflamatórias derivadas de monócitos, a IL-10 possui efeito regulatório direto na diferenciação e proliferação das células T através da inibição de citocinas como IL-12 e IFN-gama por clones de células B ativadas (MALEFYT et al., 1993).

Doenças inflamatórias intestinais e outras patologias inflamatórias exacerbadas foram diagnosticadas em camundongos com deficiência de IL-10, sugerindo uma importante função da IL-10 *in vivo* que limita as respostas inflamatórias (KUHN et al., 1993)

Hart et al., (2004) perceberam que a preparação de micro-organismos probióticos e imunomoduladores VSL#3 comportou-se como um potente indutor da produção de IL-10 pelas células dendríticas do sangue e tecido intestinal de humanos submetidos ao estudo. Os autores concluíram que bactérias deste tipo diferem na sua atividade imunomoduladora e influência sobre a resposta imune de fase inicial envolvendo a apresentação de antígenos pelas células dendríticas.

Imaoka et al., (2008) avaliaram a ação anti-inflamatória de duas cepas de *Bifidubacterium* e observaram que houve um aumento na produção de IL-10 pelas células mononucleares do sangue periférico de pacientes acometidos por colite ulcerativa. Madsen (2006) acredita que a superprodução de IL-10 pelas diferentes cepas de *Bifidubacterium* pode atuar tanto por seus efeitos anti-inflamatórios quanto por aumentar a geração de células T regulatórias. Os achados de Smits et al., (2005) corroboram com estes resultados.

Generoso (2010) avaliou o potencial de *Saccharomyce boulardii*, uma levedura não patogênica com ação imunomoduladora, no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal em camundongos. Seus achados indicam um aumento nos níveis de IL-10 nos animais tratados, e a autora defende que esta citocina pode atuar modulando a resposta imunológica, contribuindo desta forma para a redução nos níveis de translocação bacteriana.

Cao et al., (2010) atribuem o papel protetor da ulinastatina no modelo de sepse murino induzido por CLP ao aumento nos níveis intestinais de IL-10 e IL-8 dos animais em estudo. Van der Poll (1995) concluíram que a sepse induzida por CLP está associada à produção aumentada de IL-10 em vários órgãos, servindo para proteger o hospedeiro contra a letalidade uma vez que o tratamento com anti-IL-10 induziu a um aumento nos níveis de TNF- α e diminuição da sobrevida dos animais.

Huber et al., (2000) defendem que o tratamento com IL-10 para o aneurisma aórtico toracoabdominal pode reduzir a resposta de citocinas inflamatórias associadas à disfunção orgânica. A imunização passiva com anti IL-10 antes da indução da endotoxemia por LPS em animais resultou em aumentos substanciais na letalidade. Além disso, a inibição de IL-10 resultou em um aumento dos níveis de TNF- α em

comparação com o grupo controle, acompanhado de maior infiltração polimorfonuclear no pulmão dos animais

Keel et al., (1997) responsabilizam o aumento da IL-10 pelo controle da inibição de citocinas pró-inflamatórias que levaram a indução da apoptose dos neutrófilo durante a sepse grave.

Confrontando os achados deste estudo com os da literatura podemos inferir que o aumento da sobrevivência bem como a melhora nos parâmetros observados estariam relacionados ao aumento significativo da produção de IL-10 nos animais pré-tratados com *Z. mobilis*, uma vez que esta citocina está intimamente ligada ao processo da sepse severa pelas suas propriedades imunomoduladoras.

5.6 Avaliação do infiltrado inflamatório no ceco

Foi realizado corte histológico do ceco dos animais dos grupos sham, controle e tratado com *Z. mobilis* visando avaliação do infiltrado inflamatório para a parede do ceco dos camundongos submetidos à sepse por CLP.

O grupo sham apresentou infiltrado neutrofílico escasso (figura 16 A), o grupo controle apresentou infiltrado moderado (figura 16 B) e o grupo tratado com *Z. mobilis* apresentou infiltrado intenso (figura 16 C).

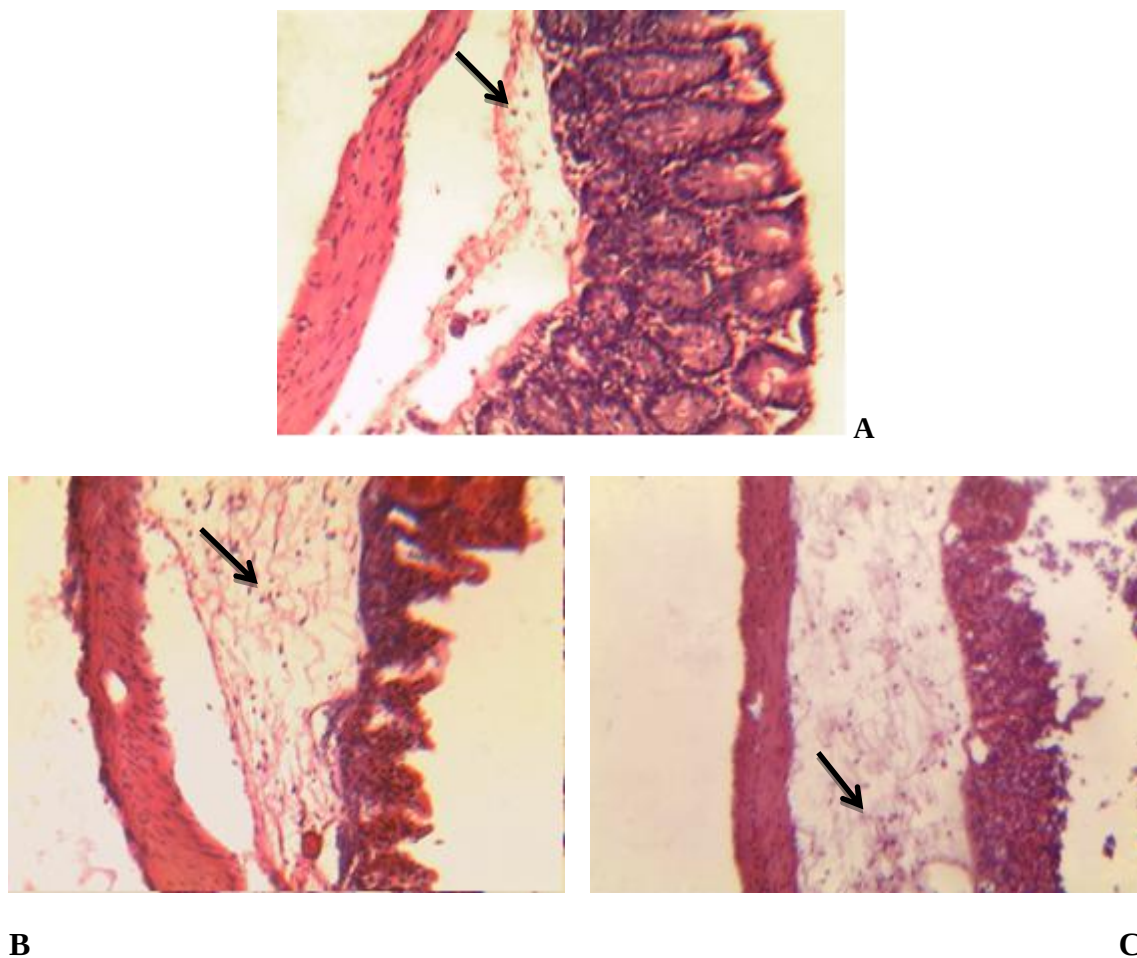


Figura 16: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* sobre a migração de células inflamatórias no ceco de animais submetidos à sepse por CLP. O ceco dos animais do grupo sham (A), controle (B) e pré-tratado com *Z. mobilis*(C) foi retirado para avaliação histológica e corado por H&E. 400X.

O aumento do infiltrado inflamatório no ceco dos animais tratados com *Z. mobilis* com relação aos grupos sham e controle corroborou com os achados referentes a melhora no recrutamento dos neutrófilos para o foco inflamatório (lavado peritoneal) quando os animais receberam a bactéria. Maciel et al.,(2008) encontraram resultados semelhantes, em que o aumento da sobrevida no grupo tratado foi acompanhado de um intenso infiltrado leucocitário no ceco dos animais.

5.7 Avaliação histopatológica do pulmão

Foi avaliado o estado histopatológico do pulmão dos animais submetidos à sepse letal por CLP e grupo sham. Este (Figura 17 A) apresentou alvéolos e bronquíolos bem preservados com hemácias distribuídas entre estes alvéolos, condizentes com a normalidade. Por sua vez, o grupo controle (Figura 17 B) apresentou intenso

estreitamento dos alvéolos, além da presença exacerbada de células inflamatórias e hemorragia. O grupo pré-tratado com *Z. mobilis* (Figura 17 C) apresentou aspectos histopatológicos semelhantes ao grupo sham, diferindo apenas com leve infiltrado leucocitário. Os achados das alterações morfológicas no tecido pulmonar corroboram com as concentrações da MPO em que o grupo pré-tratado com *Z. mobilis* apresentou redução na lesão pulmonar pela diminuição dos níveis desta enzima presente nos neutrófilos.

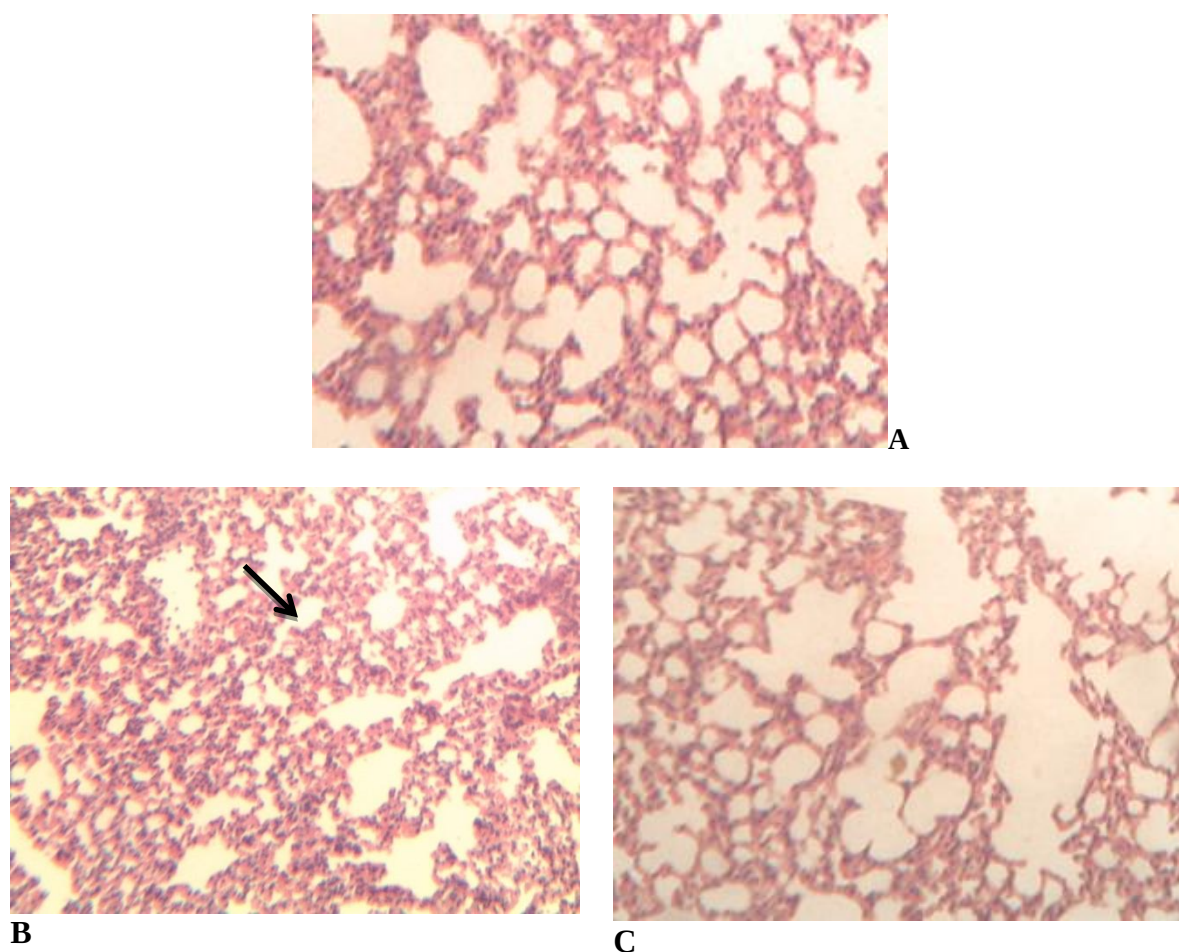


Figura 17: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* sobre alterações histopatológicas no pulmão de animais submetidos à sepse por CLP. O pulmão dos animais do grupo sham (A), controle (B) e pré-tratado com *Z. mobilis*(C) foi retirado para avaliação histológica e corado por H&E. 400x.

5.8 Avaliação da apoptose dos linfócitos no baço

A apoptose dos linfócitos tem um papel central na fisiopatologia da sepse. A prevenção da apoptose em um tipo de célula pode conferir benefícios às células vizinhas (CHANG et al., 2007). Estudos em animais experimentais e em pacientes humanos com sepse têm demonstrado o aumento da apoptose nos órgãos linfoides o que contribui para a imunossupressão e anergia dos linfócitos, desencadeando a falha múltipla orgânica e provável morte (OBERHOLZER et al., 2001). Para avaliar se a redução da apoptose dos linfócitos no baço era um provável mecanismo de ação efetuado por *Z. mobilis* e que poderia ser um dos fatores responsáveis pelo aumento da sobrevivência dos animais do grupo pré-tratado com esta bactéria, foi realizada a análise em microscopia eletrônica de transmissão nos animais submetidos à sepse por CLP. O grupo controle apresentou 83% de linfócitos apoptóticos. Em contrapartida, o grupo pré-tratado com *Z. mobilis* obteve uma redução da apoptose dos linfócitos com apenas 24% comparando-se ao grupo sham que apresentou 19% de linfócitos apoptóticos nas amostras investigadas.

O grupo controle (figuras 18 A e B) apresentou uma grande quantidade de células com núcleo desfeito e cromatina condensada ao redor do núcleo o que caracteriza o processo de apoptose (AYALA et al., 1998). Entretanto, o grupo tratado com *Z. mobilis* (figuras 18 C e D) e o grupo sham (figuras 18 E e F) apresentaram a maioria das células condizentes com a normalidade.

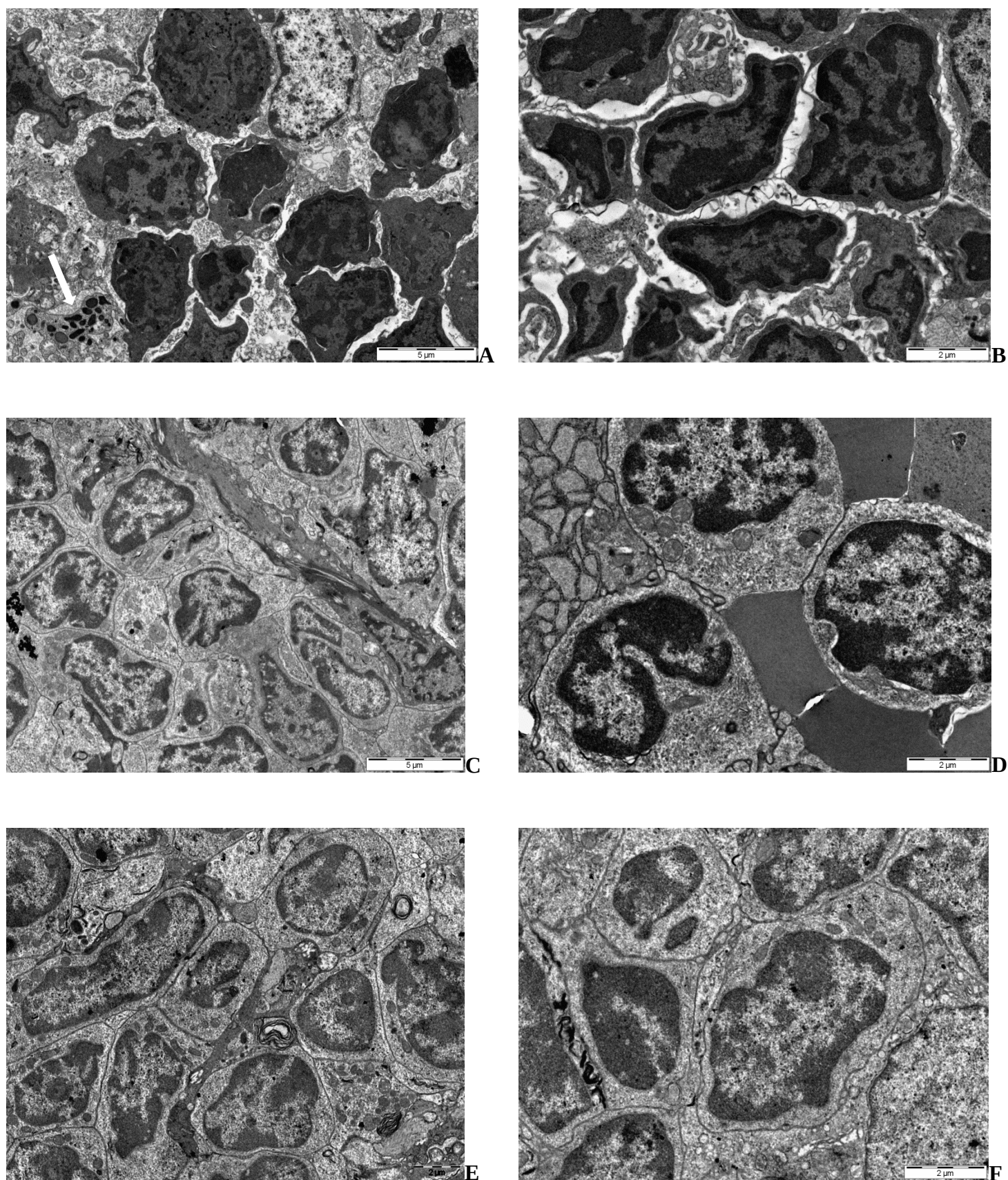


Figura 18: Efeito do pré-tratamento de *Z. mobilis* sobre apoptose dos linfócitos no baço de animais submetidos à sepse por CLP. O baço dos animais do grupo controle em que há presença de corpos

apoptóticos (A/3.500X) e (B/7.500X), pré-tratado com *Z. mobilis*(C/ 3.500X) e (D/7.500X) e sham (E/3.500X) e (F/7.500X) foi retirado para avaliação através da microscopia eletrônica de transmissão.

Watanabe et al., (2009) investigaram pacientes humanos com sepse bem como camundongos experimentais e concluíram que a vacuolização dos hepatócitos aumenta a autofagia durante a sepse e está associada à lesão mitocondrial. Entretanto, estes mesmos autores perceberam que em contraste com os hepatócitos, através da análise por microscopia eletrônica, foi possível perceber que os esplenócitos não sofriam autofagia, mas sim extensa apoptose que foi a responsável pela morte desta população celular.

Camundongos que supreeexpressam a AKT, uma quinase reguladora chave da morte e proliferação celular, obtiveram uma acentuada melhora na taxa de sobrevivência em comparação ao grupo selvagem, apresentando 94 e 47% respectivamente. Os camundongos transgênicos apresentaram ainda uma redução na apoptose dos linfócitos bem como uma maior propensão a liberação de citocinas via Th1 (BOMMHARDT et al., 2004).

A apoptose dos linfócitos é um processo natural que ocorre para eliminar linfócitos auto-reativos. Entretanto, durante a sepse ocorre a apoptose dos linfócitos de forma desregulada no timo, baço e GALT. Isto pode levar à supressão imunológica, deixando o paciente vulnerável resultando na falência múltipla dos órgãos (WESCHE et al., 2005). Estudos com animais que receberam ferro após sepse por CLP indicam que o tratamento diminuiu a sobrevivência, facilitando a proliferação bacteriana e aumento da apoptose de linfócitos e células do epitélio intestinal através da ativação da caspase-3 (JAVADI et al., 2004).

Groesdonk et al., (2007) concluíram que o aumento da ativação da via do NFκ-B previne a apoptose das células T e melhora a sobrevivência em camundongos submetidos à sepse por CLP. Em outro estudo camundongos caspase-3 -/- tiveram diminuição da apoptose dos linfócitos, melhorando a sobrevivência em modelo de sepse letal (HOTCHKISS et al., 2000).

Na sepse a morte celular pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Enquanto as células apoptóticas podem induzir a uma anergia prejudicando o hospedeiro, as células necróticas poderiam causar ativação do sistema imune aprimorando as defesas contra micro-organismos patogênicos. Desta forma, Hotchkiss et al., (2003) verificaram que a transferência adotiva de esplenócitos apoptóticos em

camundongos sépticos aumentou substancialmente a mortalidade. Em contraste, a transferência de esplenócitos necróticos aumentou a sobrevivência.

A apoptose das células epiteliais gastrointestinais pode comprometer a integridade da parede intestinal, o que poderia resultar em translocação bacteriana para a circulação sanguínea (HOTCHKISS, COOPERSMITH, KARL, 2005). A bactéria *Z. mobilis* possui ação imunomoduladora através da regulação de citocinas e diminuição da apoptose dos linfócitos presentes no baço. Sua capacidade poderia se estender também à diminuição da apoptose das células gastrointestinais, pois houve diminuição da concentração bacteriana no lavado peritoneal no grupo pré-tratado com *Z. mobilis*.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Este estudo demonstrou que os tratamentos profilático e profilático associado ao terapêutico com *Z. mobilis* ocasionou um aumento na taxa de sobrevivência de camundongos submetidos à sepse letal por CLP;
- O efeito protetor na sobrevivência dos animais está relacionado com o aumento da migração de neutrófilos para o foco infeccioso e diminuição do número de UFC no lavado peritoneal no grupo tratado com *Z. mobilis* em relação ao grupo controle;
- O papel protetor na sobrevivência dos animais envolve ainda a imunomodulação, com redução nos níveis de TNF- α . Entretanto, não houve nenhuma alteração nos níveis de MCP-1 no grupo pré-tratado com *Z. mobilis*, sugerindo que esta quimiocina não interfere na ação da bactéria;
- Ocorreu aumento na produção das citocinas IL-6 e IL-10, sendo que os dados referentes a esta última podem explicar, em parte, a ação benéfica de *Z. mobilis* frente à CLP, por se tratar de uma citocina com ação anti-inflamatória e imunorregulatória.
- A análise histopatológica do ceco dos animais do grupo pré-tratado mostrou redução dos danos celulares neste órgão que são característicos da CLP com relação ao grupo controle;
- A redução nos níveis de MPO para o grupo pré-tratado com *Z. mobilis* com relação ao grupo controle foram condizentes com os achados histopatológicos do pulmão, indicando que houve melhora na resposta a lesão pulmonar aguda característica da sepse;
- Houve redução significativa na apoptose dos linfócitos no baço dos animais tratados com *Z. mobilis* em relação ao grupo controle. O percentual de células apoptóticas no grupo tratado esteve muito próximo ao grupo sham, sugerindo uma importante via de atuação benéfica para a bactéria investigada;
- Os parâmetros analisados neste trabalho e os resultados encontrados mostram que *Z. mobilis* possui atividade imunomoduladora *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E., LATERRE, P.F, GARBINO, J., PINGLETON, S., BUTLER, T., DUGERNIER, T., MARGOLIS, B., KUDSK, K., ZIMMERLI, W., ANDERSON, P., REYNAERT, M., LEW, D., LESSLAUER, W., PASSE, S., COOPER, P., BURDESKA, A., MODI, M., LEIGHTON, A., SALGO, M., VAN DER AUWERA, P. ABRAHAM, E., MATTHAY, M.A., DINARELLO, C.A., VINCENT, J.L., COHEN, J., OPAL, S.M., GLAUSER, M., PARSONS, P., FISHER, C.J., REPINE, J.E. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. **Crit Care Med.** v.28, n.1, p.232-235, 2000.

ACCP/SCCM- 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, 1992.

ADHIKARI, N.K.J., FOWLER, R., BHAGWANJEE, S., RUBENFELD, G. Critical care and the global burden of critical illness in adults. **Lancet.** V.376, n.9749, p.1339-46, 2010.

AKIRA, S., HEMMI, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. **Immunol Lett.** V.85, n.2, p.85-95, 2003.

AKIRA, S., UEMATSU, S., TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell.** V.124, n.4, p.783-801, 2006.

ALBERTI, C., BRUN-BUISSON, C., BURCHARDI, H., MARTIN, C., GOODMAN, S., ARTIGAS, A., SICIGNANO, A., PALAZZO, M., MORENO, R., BOULME, R., LEPAGE, E., LE GALL, R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Med.** v. 28, n.2, p.108-121, 2002.

ALEXOPOULOU, L., HOLT, A.C., MEDZHITOV, R., FLAVELL, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature Medicine.** V.413, p.732-738, 2001.

ALVAREZ-OLMOS, M.I., OBERHELMAN, R.A. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. **Clin Infectious Diseases.** V.32, n.11, p.1567-1576, 2001.

ALVES-FILHO, J.C., DE FREITAS, A., RUSSO, M., CUNHA, F.Q. *Toll-like* receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med.** V.34, n.2, p.461-70, 2006.

ALVES-FILHO, J.C., SÔNEGO, F., SOUTO, F.O., FREITA, A., VERRI, W.A., AUXILIADORA-MARTINS, M., BASILE-FILHO, A., ANDRMCKENZIE, A. N., DAMO XU, FERNANDO Q CUNHA, LIEW, F.Y. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature Medicine.** V.16, n.6, p.708-12, 2010.

ANDERSON, K.V. Toll signaling pathways in the innate immune response. **Curr Opin Immunol**. V.12, n.1, p.13-9, 2000.

ANGUS, D.C., LINDE-ZWIRBLE, W.T., LIDICKER, J., CLERMONT, G., CARCILLO, J., PINSKY, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**. V.29, n.7, p.1303-1310, 2001.

AYALA, A., HERDON, C.D., LEHMAN, D.L., AYALA, C.A., CHAUDRY, I.H. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: Variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. **Blood**. V.87, n.10, p.4261-75, 1996.

AYALA, A., HERDON, C.D., LEHMAN, D.L., DEMASO, C.M., AYALA, C.A., CHAUDRY, I.H. The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis: Control by corticosteroids but not tumor necrosis factor. **Shock**. V.3, n.4, p.259-67, 1995.

AZERÊDO, G.A. Efeito da ingestão de *Zymomonas mobilis* em ratos Wistar. **Dissertação (Mestrado em Nutrição)**. Universidade Federal de Pernambuco. 2004.

BACELAR, T. S. A ação da *Zymomonas mobilis* na peritonite experimental: influência no desenvolvimento de peritonite, mortalidade e formação de abscesso. **Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)**. Universidade Federal de Pernambuco. 1997.

BAGBY, G.J., PLESSALA, K.J., WILSON, L.A., THOMPSON, J.J., NELSON, S. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor- α in intravascular and peritonitis models of sepsis. **J Infect Dis**. V.163, n.1, p.83, 1991.

BAO, H., LI, S. Effects of Propofol on the Outcomes of Rats with Sepsis. **Journal of Surgical Research**. V.168, n.1, p.111–115, 2011.

BARKER, B.T. Some recent studies on the nature and incidence of cider sickness. **Annu Rep Agric Hort Res Stn Long Ashton Bristol**. P.174-181, 1948.

BARKER, B.T.P., HILLIER, V.F. Cider sickness. **J Agric Sci**. V.5, p.67-85, 1912.

BARTON, B.E. IL-6: insights into novel biological activities. **Clin Immunol Immunopathol**. V.85, n.1, p.16-20, 1997.

BAUER, S., PIGISCH, S., HANGEL, D., KAUFMANN, A., HAMM, S. Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. **Immunobiology**. V.213, n.3-4, p.315-28, 2008.

BEFFA, D.C., FISCHMAN, A.J., FAGAN, S.P., HAMRAHI V.F., PAUL, K.W., KANEKI, M., YU, Y.M., TOMPKINS, R.G., CARTER, E.A. Simvastatin treatment improves survival in a murine model of burn sepsis: Role of interleukin 6. **Burns**. V.37, n.2, p.222-6, 2011.

- BEHERA, S., MOHANTY, R.C., RAY, R.C. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. **Applied Energy**. V.87, p.2352–2355, 2010.
- BEKERS, M., UPITE, D., KAMINSKA, E., LAUKEVICS, J. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**. V.40, n.5, p.1535–1539, 2005.
- BENJAMIM, C.F., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**. V.182, n.1, p.214–223, 2000.
- BENJAMIM, C.F., SILVA, J.S., FORTES, Z.B., OLIVEIRA, M.A., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. Inhibition of Leukocyte Rolling by Nitric Oxide during Sepsis Leads to Reduced Migration of Active Microbicidal Neutrophils. **Infection and Immunity**. V.70, n.7, p. 3602–610, 2002.
- BESSELINK, M. G.H, TIMMERMAN, H. T., BUSKENS, E., NIEUWENHUIJS, V. B., AKKERMANS, L. M., GOOSZEN, H. G. and the members of the Dutch Acute Pancreatitis Study Group. Probiotic prophylaxis in patients with predicted severe acute pancreatitis (PROPATRIA): design and rationale of a double-blind, placebo-controlled randomised multicenter trial. **BMC Surgery**. V.4, n.12, p.1-7, 2004.
- BOSSINK, A.W., PAEMEN, L., JANSEN, P.M., HACK, C.E., THIJS, L.G., VAN DAMME, J. Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. **Blood**. V.86, n.10, p.3841-7, 1995.
- BOZZA, F.A., BOZZA, P.T., CASTRO FARIA NETO, H.C. Beyond sepsis pathophysiology with cytokines: what is their value as biomarkers for disease severity? **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V.100, p.217-21, 2005.
- BOZZA, P.T., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., SILVA, A.R., LARANGEIRA, A.P., SILVA, P.M., MARTINS, M.A., CORDEIRO, R.S. Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. **Eur J Pharmacol**. V.270, n.2-3, p.143-9, 1994.
- BRANDTZAEG, P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. **APMIS**. V.103, p.1–19, 1995.
- BURAS, J.A., HOLZMANN, B., SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**. V.4, n.10, 854-65, 2005.
- CADIRCI, E., ALTUNKAYNAK, B. Z., HALICI, Z., ODABASOGLU, F., UYANIK, H., GUNDOGDU, C.F., SULEYMAN, H., HALICI, M., ALBAYRAK, M.F., UNAL, B. Lipoic acid as a potential target for the treatment of lung injury caused by cecal ligation and puncture-induced Sepsis model in rats. **Shock**. V.33, n.5, p.479-484, 2010.
- CALAZANS, G.M.T. Produção de levana para uso clínico. RJ, Brasil. **Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1997.

CALAZANS, G.M.T., LOPES, C.E., LIMA, R.C., FRANÇA, F.P. Molecular weight and antitumour activities of *Zymomonas mobilis* levans. **Int J Biol Macromol.** V.27, p. 245-247, 2000.

CAO, Y., TU, Y., CHENB, X., WANG, B., ZHONG, Y., LIUC, M. Protective effect of Ulinastatin against murine models of sepsis: Inhibition of TNF- α and IL-6 and augmentation of IL-10 and IL-13. **Experimental and Toxicologic Pathology.** 2010.

CARR, J. G. Genus *Zymomonas*. In: *Bergey's: Manual of determinative bacteriology*. 8. ed. Baltimore:Williams & Wilkins. P.8-21. 1974.

CARR, J.G., PASSMORE, S.M. Discovery of the "cider-sickness" bacterium *Zymomonas anaerobia* in apple pulp. **Journal of the Institute of Brewing.** V.77, p.462-466, 1971.

CARVALHO, M., BENJAMIM, C., SANTOS, F., FERREIRA, S., CUNHA, F. Effect of mast cells depletion on the failure of neutrophil migration during sepsis. **Eur J Pharmacol.** V.21, n.525, p.161-9, 2005.

CERF-BENSUSSAN, N., GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nature Reviews Immunology.** V.10, p.735-744, 2010.

CETINA-SAURI G, SIERRA BASTO G. Evaluation Therapeutique de *Saccharomyces boulardii* chez dans enfants souffrant de diarrhea aigue. **Extrait Ann Pediatrice.** P.41-6, 1994.

CHANG, K.C., UNSINGER, J., DAVIS, C.G., SCHWULST, S.J., MUENZER, J.T., STRASSER, A., HOTCHKISS, R.S. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis. **The FASEB Journal.** V.21, p.708-19, 2007.

CHEN, C. C., LOUIE, S., SHI, H. N., WALKER, W. A. Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. **Pediatr Res.** V.58, n.5, p.1185-1191, 2005.

CHUNG, C. S., SONG, G. Y., LOMAS, J., SIMMS, H. H., CHAUDRY, I. H., AYALA, A. Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. **J. Leukocyte Biol.** v.74, p. 344-351, 2003.

CHUNG, C.S., XU, Y.X., WANG, W., CHAUDRY, I.H., AYALA, A. Is Fas ligand or endotoxin responsible for mucosal lymphocyte apoptosis in sepsis? **Arch Surg.** V.133, n.11, p.1213-1220, 1998.

CIPOLLE, M.D., PASQUALE, M.D. CERRA, F.B. Secondary organ dysfunction. From clinical perspectives to molecular mediators. **Crit Care Clin.** V.9, n.2, p.261-98, 1993.

COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature.** V.420, p.885-91, 2002.

COHEN, J.J., DUKE, R.C., FADOK, V.A., SELLINS, K.S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Ann Rev Immunol**. V.10, p.267-93, 1992.

COOK, D.N., PISETSKY, D.S., SCHWARTZ, D.A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. **Nat Immunol**. V.5, p.975–979, 2004.

COOPERSMITH, C.M., CHANG, K.C., SWANSON, P.E., TINSLEY, K.W., STROMBERG, P.E., BUCHMAN, T.G., KARL, I.E., HOTCHKISS, R.S. Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice. **Crit Care Med**. V.30, n.1, p.195-201, 2002.

COOPERSMITH, C.M., STROMBERG, P.E., DUNNE, W.M., DAVIS, C.G., BUCHMAN, T.G., KARL, I.E., HOTCHKISS, R.S. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. **JAMA**. V.287, n.13, p.1716–1721, 2002.

CREAGH, E.M., MARTIN, S.J. Caspases: cellular demolition experts. **Biochem Soc Trans**. V.29, n.6, p.696–702, 2001.

CREAGH, E.M., CONROY, H., MARTIN, S.J. Caspase activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunol Rev**. V.193, p.10–21, 2003.

CRIBBS, S.K., MARTIN, G.S. Going global with sepsis: the need for national registries. **CritCare Med**. V.37, n.1, p.338–40, 2009.

CROSARA-ALBERTO, D.P., DARINI, A.L.C., INOUE, R.Y., SILVA, J.S., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. **BrJ Pharmacol**. V.136, n.5, p. 645 658, 2002.

CROSS, A.S., OPAL, S.M., SADOFF, J.C., GEMSK, P. Choice of bacteria in animal models of sepsis. **Infect Immun**. V.61, n.7, 2741-2747, 1993.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S., AHRNE, S., BENGMARK, S., JOHANN-LIANG, R., MARSHALL, F., METAKIS, L. B.S., CALIFANO, C. B., DUNN, A. R. N., GRASSEY, C. R.N., HINDS, G. R. N., CERVIA, J. Probiotics and Immune Response. **The American Journal of Gastroenterology**. V.95, n.1, p.22-25, 2000.

DADDS, M. J.; MARTIN, P. A. The genus *Zymomonas* a review. **Journal of the Institute of Brewing**. V.79, p.386-391, 1973.

DALRYMPLE, S.A., LUCIAN, L.A., SLATTERY, R., MCNEIL, T., AUD, D.M., FUCHINO, S., LEE, F., MURRAY, R. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. **Infect Immun**. V.63, n.6, p.2262-8, 1995.

DALRYMPLE, S.A., SLATTERY, R., AUD, D.M., KRISHNA, M., LUCIAN, L.A., MURRAY, R. Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection. **Infect Immun**. V.64, n.8, p.3231-5, 1996.

DAMAS, P., LEDOUX, D., NYS, M., VRINDTS, Y., GROOTE, D. FRANCHIMONT, P., LAMY, M. Cytokine Serum Level During Severe Sepsis in Human IL-6 as a Marker of Severity. **Cytokines and sepsis**.V.215, n.4, 1991.

DAVID, S., PARK, J., VAN MEURS, M., ZIJLSTRA, J., KOENECKE, C., SCHRIMPF, C., SHUSHAKOVA, N., GUELER, F., HALLER, H. A., KÜMPERS, P. Acute administration of recombinant Angiopoietin-1 ameliorates multiple-organ dysfunction syndrome and improves survival in murine sepsis. **Cytokine**.V.55, n.2, p.251- 259, 2011.

DE BONT, E.S., MARTENS, A., VAN RAAN, J., SAMSON, G., FETTER, W.P., OKKEN, A., DE LEIJ, L.H., KIMPEN, J.L. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis.**Acta Paediatr**.V.83, n.7, p.696-9, 1994.

DE MORENO, D. L. B. A., CHAVES, S., CARMUEGA, E., WEILL, R., ANTOINE, J., PERDIGON, G. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. **Immunobiology**.V.213, n.2, p.97-108, 2008.

DEITCH, E.A. Rodent models of intra-abdominal infection. **Shock**.V.24, p.1-19, 2005.

DEJAGER, L., PINHEIRO, I., DEJONCKHEERE, E., LIBERT, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**.V.19, n.4, p.198-208, 2011.

DELCENSERIE, V., MARTEL, D., LAMOUREUX, M., AMIOT, J., BOUTIN, Y., ROY, D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Curr Issues Mol Biol**.V.10, p.37-54, 2008.

DYSON, A., SINGER, M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? **Crit Care Med**.V.37, p.30 -7, 2009.

EBERL, G., LOCHNER, M. The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota.**Mucosal Immunol**.V.2, n.6, p.478–485, 2009.

ECHCHANNAOUI, H., FREI, K., SCHNELL, C., LEIB, S.L., ZIMMERLI, W., LANDMANN, R. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. **J Infect Dis**. V.186, n.6, p.798–806, 2002.

EFRON, P.A., TINSLEY, K., MINNICH, D.J., MONTERROSO, V., WAGNER, J., LAINÉE, P., LORRÉ, K., SWANSON, P.E., HOTCHKISS, R., MOLDAWER, L.L. Increased lymphoid tissue apoptosis in baboons with bacteremic shock.**Shock**.V.21, n.6, p.566–571, 2004.

ERNANDES, F.M.P.G. Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo de cana-de açúcar). 2006. **Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos)**. Universidade Estadual Paulista. 2006.

ERNANDES, F.M.P.G., GARCIA-CRUZ, C.H. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrária**. V. 30, n.2, p.361-80, 2008.

EWASCHUK, J., ENDERSBY, R., THIEL, D., DIAZ, H., BACKER, J., MA, M., CHURCHILL, T., MADSEN, K. Probiotic bacteria prevent hepatic damage and maintain colonic barrier function in a mouse model of sepsis. **Hepatology**. V.46, n. 3, p. 841-50, 2007.

FADOK, V.A., BRATTON, D.L., KONOWAL, A., FREED, P.W., WESTCOTT, J.Y., HENSO, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit pro-inflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. **J Clin Invest**. V.101, n.4, p.890–898, 1998.

FALCÃO DE MORAIS, J.O. *Zymomonas mobilis* e seu emprego como agente de fermentação alcoólica. **Rev InstAntib**. N.1 e 2, p.169-182, 1982/1983.

FAN, H., LI, P., ZINGARELLI, B., BORG, K., HALUSHKA, P.V., BIRNBAUMER, L., COOK, J.A. Heterotrimeric G α i proteins are regulated by lipopolysaccharide and are anti-inflammatory in endotoxemia and polymicrobial sepsis. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1813, n.3, p.466-472, 2011.

FANG, H.A.C, TUOMOLA, E.A., HEIKKI, B. A. M., SALMINEN, S. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. V.29, n.1, p.47-52, 2000.

FAURSCHOU, M., BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**. V.5, n.14, p.1317-27, 2003.

FINK, M., ABRAHAM, E., VINCENT, J.L., REINHART, K., BLOOS, F., BRUNKHORST, F.M. Pathophysiology of sepsis and multiple organ dysfunction. In: FINK, M.P., ABRAHAM, E., VINCENT, J.L., KOCHANIEK, P.M., editors. Textbook of critical care. 5th ed. Philadelphia: **Elsevier Saunders**. P.1249-1258, 2005.

FISHER JR., C.J., DHAINAUT, J.F., OPAL, S.M., PRIBBLE, J.P., BALK, R.A., SLOTMAN, G.J., IBERI, T.J., RACKOW, E.C., et al. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. **JAMA**. V.271, n.23, p.1836-43, 1994.

FOLIGNE, B., ZOUMPOPOULOU, G., DEWULF, J., BEN YOUNES, A., CHAREYRE, F., SIRARD, J. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. **PLoS ONE**. V.2, n.3, p.313, 2007.

FRUCHT, D.M., FUKAO, T., BOGDAN, C., SCHINDLER, H., O'SHEA, J.J., KOYASU, S. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends Immunol**. V.22, n.10, p.556-60, 2001.

FUNK, D. J., PARRILLO, J. E., KUMAR, A. A sepsis and shock septic: a history. **Crit Care Clinic**.V.83, n.25, p.101, 2009.

GALANOS, C., FREUDENBERG, M.A. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity.**Immunobiology**.V.187, n.3-5, p.346-56, 1993.

GALANOS, C., LÜDERITZ, O., RIETSCHER, E., WESTPHAL, O., BRADE, H., BRADE, L., FREUDENBERG, M., SCHADE, U., IMOTO, M., YOSHIMURA, H., KUSUMOTO, S., SHIBA, T. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. **Eur J Biochem**.V.148, n.1, p.1-5, 1985.

GAUR ,U., AGGARWAL, B.B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Biochem Pharmacol**.V.66, n.8, p.1403-8, 2003.

GENEROSO, S.V. Leveduras probióticas no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal em camundongos. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)**. Universidade Federal de Minas Gerais. 2010.

GEROULANOS, S., DOUKA, E.T. Historical perscpective of the word sepsis. **Intensive Care Med**. V.32, n.12, p.2077, 2006.

GESSANI, S., BELARDELLI, F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance.**Cytokine Growth Factor Rev**.V.9, n.2, p.117-23, 1998.

GIBBS, M., DE MOSS, R.D. Anaerobic dissimilation of C14 labelled glucose and fructose by pseudomonas lindineri. **Journal of Biological Chemistry**.V.207, p.689 694, 1954.

GISMONDO, M. R., DRAGO, A., LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial Agents**.V.12, n.4, p.287–292, 1999.

GLAUSER, M.P., HEUMANN, D., BAUMGARTNER, J.D., COHEN, J. Pathogenesis and potential strategies for prevention and tretament of septic shock; an update. **Clin Infect Dis**. V.18, n.2, p.205-216, 1994.

GOGOS, C.A., DROSOU, E., BASSARIS, H.P., SKOUTELIS, A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. **J Infect Dis**.V.181, n.1, p.176-80, 2000.

GOLDSTEIN, B., BRETT GIROIR, B., RANDOLPH, A., THE, M. O., SEPSIS, I. C. C. O. P. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Pediatr Crit Care Med**.V.6,n.1, 2005.

GOMES, R.N. Potencial terapêutico da PAF-acetilhidrolase (PAF-AH) no controle da sepse. **Tese (Dourado em Biologia Celular e Molecular)**. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2006.

GONÇALVES DE LIMA, O. Sobre uma interessante e pouco conhecida publicação de

Paul Lindner acerca do emprego terapêutico de *Zymomonas mobilis* Kluver e Van Niel, 1936(= *Pseudomonas lindneri*). **Rev Inst Antib.** V.1:2, p.119-124, 1968.

GONÇALVES DE LIMA, O., ARAÚJO, J. M., SCHUMACHER, I. E., SILVA, E. C. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. **Rev Inst Antib.** V.10, p.3-15, 1970.

GORDON, A.C., LAGAN, A. L., AGANNA, E., CHEUNG, L., PETERS, C.J., MCDERMOTT, M. F., MILLO, J. L., WELSH, K.I., HOLLOWAY, P., HITMAN, G.A., PIPER, R.D., GARRARD, C.S., HINDS, C.J. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicenter study. **Genes Immun.** V.5, n.8, p.631-40, 2004.

GRIFFITH, T. S., YU, X., HERNDON, J.M., GREEN, D.R., FERGUSON, T.A. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. **Immunity.** V.5, n.1, p.7-16, 1996.

HACK, C.E., AARDEN, L.A., THIJIS, L.G. Role of cytokines in sepsis. **Adv Immunol.** V.66, p.101-95, 1997.

HALPERN, N.A., PASTORES, S.M. Critical care medicine in the United States 2000–2005: an analysis of bed numbers, occupancy rates, payer mix, and costs. **Crit Care Med.** V.38, n.1, p.65–71, 2010.

HAMPTON, M.B., KETTLE, A.J., WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood.** V.92, n.9, p.3007 - 3017, 1998.

HART, A.L., LAMMERS, K., BRIGID, P., VITALI, B., RIZZELLO, F., GIONCHETTI, P., CAMPIERI, M., KAMM, M.A., KNIGHT, S.C., STAGG, J.A. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. **Gut.** V.53, p.1602-1609, 2004.

HAYASHI, F., SMITH, K.D., OZINSKY, A., HAWN, T.R., YI, E.C., GOODLETT, D.R., ENG, J.K., AKIRA, S., UNDERHILL, D.M., ADEREM, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature Medicine.** V.410, p.1099-103, 2001.

HAZIOT, A., FERRERO, E., KONTGEN, F., HIJYA, N., YAMAMOTO, S., SILVER, J., STEWART, C.L., GOYERT, S.M. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. **Immunity.** V.4, n.4, p.407-414, 1996.

HE, M., MOOCHHALA, S.M., ADHIKARI, S., BHATIA, M. Administration of exogenous fractalkine, a cx3c chemokine, is capable of modulating inflammatory response in cecal ligation and puncture induced sepsis. **Shock.** V.31, n.1, p.33-39, 2009.

HENGST, J.M. The role of C-reactive protein in the evaluation and management of infants with suspected sepsis. **Adv Neonatal Care.** V.3, n.1, p.3-13, 2003.

HIRAMATSU, M., HOTCHKISS, R.S., KARL, I. E., BUCHMAN, T.G. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. **Shock**.V.7, n.4, p.247–253, 1997.

HOPKINS, P.A., SRISKANDAN, S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. **Clin Exp Immunol**.V.140, n.3, p.395-407, 2005.

HOTCHKISS, R.S., CHANG, K.C., GRAYSON, M.H., TINSLEY, K.W., DUNNE, B.S., DAVIS, C.G., OSBORNE, D.F., KARL, I.E. Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. **PNAS**.V.100, n.11, p.6724–6729, 2003.

HOTCHKISS, R. S., KARL, J.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med**. V.348, n.2, p.138-50, 2003.

HOTCHKISS, R.S., NICHOLSON, D.W. Apoptosis and caspases regulated death and inflammation in sepsis. **Natural Reviews Immunology**.V.6, p.813-22, 2006.

HOTCHKISS, R.S., OSMON, S.B., CHANG, K.C., WAGNER, T.H., COOPERSMITH, C.M., KARL, I.E. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. **J Immunol**.V.174, n.8, p.5110–5118, 2005.

HOTCHKISS, R.S., SWANSON, P.E., COBB, J.P., JACOBSON, A., BUCHMAN, T.G., KARL, I.E. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. **Crit Care Med**. V.25, n.8, p.1298–1307, 1997.

HOTCHKISS, R.S., SWANSON, P.E., FREEMAN, B.D., TINSLEY, K.W., COBB, J.P., MATUSCHAK, G.M., BUCHMAN, T.G., KARL, I.E. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. **Crit Care Med**.V.27, n.7 p.1230–1251, 1999.

HOTCHKISS, R.S., SWANSON, P.E., KNUDSON, C.M., CHANG, K.C., COBB, J.P., OSBORNE, D.F., ZOLLNER, K.M., BUCHMAN, T.G., KORSMEYER, S.J., KARL, I.E. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. **J Immunol**.V.162, n.7, p.4148–415, 1999.

HOTCHKISS, R.S., TINSLEY, K.W., SWANSON, P.E., GRAYSON, M.H., OSBORNE, D.F., WAGNER, T.H., COBB, J.P., COOPERSMITH, C., KARL, I.E. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. **J Immunol**.V.168, n.5 2493–2500, 2002.

HUBER, T.S., GAINES, G.C., WELBORN, B.M., ROSENBERG, J.J., SEEGER, J.M.; MOLDAWER, L.L. Anticytokine Therapies for Acute Inflammation and the Systemic Inflammatory Response Syndrome: Il-10 and Ischemia/Reperfusion Injury As A New Paradigm. **Shock**.V.13, n.6, p.425-434, 2000.

IMAOKA, A., SHIMA, T., KATO, K., MIZUNO, S., UEHARA, T., MATSUMOTO, S., SETOYAMA, H., HARA, T., UMESAKI, Y. Anti-inflammatory activity of

probiotic Bifidobacterium: Enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. **World J Gastroenterol.** V.14, n.16, p.2511-2516, 2008.

ISAACS, A., LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. **Proc R Soc Lond Biol Sci B.** V.147, p.258-67, 1957.

ISOLAURI, E., SÜTAS, Y., KANKAANPÄÄ, P., ARVILOMMI, H., SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **Am J Clin Nutr.** V.73, n.2, p.444–50, 2001.

IWASAKI, A., MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol.** V.5, p.987-995, 2004.

JALES, S.T.L. Avaliação da atividade microbiológica e tecnologia de obtenção das formas farmacêuticas cápsulas e flaconetes à base de *Zymomonas mobilis*. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)**. Universidade Federal de Pernambuco. 1999.

JANEWAY JÚNIOR C.A., TAVARES, P.E., WALPORT, M., SHLOMCHICK, M.J. Immunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença. **Artmed.** P.24, 2007.

JAVADI, P., BUCHMAN, T.G., STROMBERG, P.E., HUSAIN, K.D., DUNNE, W.M., WOOLSEY, C.A., TURNBULL, I.R., HOTCHKISS, R.S., KARL, I.E., COOPERSMITH, C.M. High-dose exogenous iron following cecal ligation and puncture increases mortality rate in mice and is associated with an increase in gut epithelial and splenic apoptosis. **Crit Care Med.** V.32, n.5, p.1178–1185, 2004.

JEREZ, M. C. D. Estudo comparativo de diferentes métodos e condições de fermentação de melaço de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis*. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)**. Universidade Estadual de Campinas. 1993.

JIANG, Y., BELLER, D.I., FRENDL, G., GRAVES, D.T. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **J Immunol.** V.148, n.8, p.2423-8, 1992.

KAUR, I.P., CHOPRA, K., SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** V.15, n.1, p.1-9, 2002.

KEEL, M., UNGETHUM, U., STECKHOLZER, U., NIEDERER, E., HARTUNG, T., TRENTZ, O., ERTEL, W. Interleikin-10 counterregulates pro-inflammatory cytokine – induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. **Blood.** V.90, n.9, p.3356- 3363, 1997.

KONG, X., HELLERMANN, G.R.G., PATTON, G., KUMAR, M., BEHERA, A., RANDALL, T.S., ZHANG, J., LOCKEY, R.F., MOHAPATRA, S.S. An immunocompromised BALB/c mouse model for respiratory syncytial virus infection. **Virol J.** V.2, n.1, p.3, 2005.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **J Am Diet Assoc.** V.101, n.2, p.229-241, 2001.

KOX, W.J., VOLK, T., KOX, S.N., VOLK, H.D. Immunomodulatory therapies in sepsis. **Intensive Care Med.** V.26, Suppl 1, p.124-8, 2000.

KUHN, R., LOHLER, J., RENNICK, D., RAJEWSKY, K., MULLER, W. Interleukin 10 deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell.** V.75, n.2, p.263-274, 1993.

LANG, J.D., MATUTE-BELLO, G. Lymphocytes, apoptosis and sepsis: making the jump from mice to humans. **Crit Care.** V.13, n.1, p.1-2, 2009.

LE TULZO, Y., PANGAULT, C., GACOUIN, A., GUILLOUX, V., TRIBUT, O., AMIOT, L., TATTEVIN, P., THOMAS, R., FAUCHET, R., DRÉNOU, B. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. **Shock.** V.18, n.6, p.487–494, 2002.

LEE, W., HUANG, C. Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal.** V.4, n.3, p.217-27, 2000.

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J.M. HOFFMANN, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell.** V.86, n.6, p.973–983, 1996.

LEON, L.R., WHITE, A.A., KLUGER, M.J. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. **Am J Physiol.** V.275, p.269-77, 1998.

LI, J., WANG, H., MASON, J.M., LEVINE, J., YU, M., ULLOA, L., CZURA, C.J., TRACEY, K.J., YANG, H. Recombinant HMGB1 with cytokine-stimulating activity. **J Immunol Methods.** V.289, n.1-2, p.211-23, 2004.

LINDSAY, J.O., HODGSON, H.J.F. Review article: the immunoregulatory cytokine interleukin-10 – a therapy for Crohn's disease? **Aliment Pharmacol Ther.** V.15, n.11, p.1709-1716, 2001.

LOBO, S.M., LOBO, F.R.M. Markers and mediators of inflammatory response in infection and sepsis. **Rev Bras Ter Intensiva.** V.19, n.2, p.210-215, 2007.

LOLIS, E., BUCALA, R. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. **Nat Rev Drug Discov.** V.2, p.635-45, 2003.

LOPES, C.A.C. Efeitos obtidos com o emprego da cultura de *Zymomonas mobilis* variedade *recifensis* em portadores de enterocolites bacterianas. **Rev Inst Ant.** V. 20, n. ½, 1980.

MA, H., KOU, J., ZHU, D., YAN, Y., YU, B. Liu-Shen-Wan, a traditional Chinese medicine, improves survival in sepsis induced by cecal ligation and puncture via reducing TNF- α levels, MDA content and enhancing macrophage phagocytosis. **International Immunopharmacology.** V.6, p.1355–1362, 2006.

MACIEL, M.C.G., FARIAS, J.C., MALUF, M.J., ELIANE, A.G., PEREIRA, P.V.S., ARAGÃO-FILHO, W.C., JOSIAS B FRAZÃO, J.B., COSTA, G.C., SOUSA, S.M.,

SILVA, L.A., AMARAL, F.M.M., RUSSO, M., GUERRA, R.N.M., NASCIMENTO, F.R.F. *Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. **Complementary and Alternative Medicine**. V.8, n.57, p.1-7, 2008.

MACPHERSON, A., GATTO, D., SAINSBURY, E., HARRIMAN, G. R., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R. M. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science**. V. 288, n.5474, p.2222-6, 2000.

MADSEN, K. Probiotics and the Immune Response. **J Clin Gastroenterol**. V.40, p.232–234, 2006.

MAIER, S., TRAEGER, T., ENTLEUTNER, M., WESTERHOLT, A., KLEIST, B., SER, N., HOLZMANN, B., STIER, A., KLAUS PFEFFER, K., HEIDECHE, C. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. **Shock**. V.21, n.6, p.505–511, 2004.

MALEFYT, W.R., YSSEL, H., VRIES, J.E. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. **J Immunol**. V.150, n.11, p.4754-4765, 1993.

MANTELL, L.L., PARRISH, W.R., ULLOA, L. HMGB-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. **Shock**. V.25, n.1, p.4-11, 2006.

MARSDEN, V. S., STRASSER, A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. **Annu Rev Immunol**. V.21, p.71–105, 2003.

MARTIN, G.S., MANNINO, D. M., EATON, S., MOSS, M. The epidemiology of sepsis in United States from 1979 through 2000. **N Eng J Med**. V.348, p.1546-1554, 2005.

MARX, G., PEDDER, S., SMITH, L., SWARAJ, S., GRIME, S., STOCKDALE, H., LEUWER, M. Resuscitation from septic shock with capillary leakage: hydroxyethyl starch (130 kd), but not Ringer's solution maintains plasma volume and systemic oxygenation. **Shock**. V.21, n.4, p.336-41, 2004.

MATSUKAWA, A., HOGABOAM, C.M., LUKACS, N.W., LINCOLN, P.M., STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. **J Immunol**. V.163, n.11, p.6148-54, 1999.

MATSUMOTO, T., ISHIKAWA, H., TATEDA, T., YAESHIMA, T., ISHIBASHI, N., YAMAGUCHI, K. Oral administration of *Bifidobacterium longum* prevents gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. **Journal of Applied Microbiology**. V.104, n.3, p.672–680, 2008.

MEDZHITOV, R., JANEWAY JR, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunol Rev**. V.173, p.89-97, 2000.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., JANEWAY, C.A. JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature Medicine**.V.388, p.394-397, 1997.

MESQUITA, A.R.C. Caracterização de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 como microrganismo probiótico. **Dissertação (Mestrado em Patologia Geral)**. Universidade Federal de Pernambuco. 2008.

MICHEAU, O., TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell**.V.114, n.2, p.181-90, 2003.

MILLIS, N.F. A study of the cider-sickness *Bacillus*: a new variety of *Zymomonas* anaerobia. **Journal of General Microbiology**.V.15, p.521-528, 1956.

MILLIS, N.F. Some bacterial fermentations of cider. **Ph.D. thesis**, University of Bristol, Bristol, U.K. 1951.

MOORE, K.J., ANDERSSON, L.P., INGALLS, R.R., MONKS, B.G., LI, R., ARNAOUT, M.A., GOLENBOCK, D.T., FREEMAN, M.W. Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. **J Immunol**.V.165, n.8, p.4272-4280, 2000.

MOORE, K.W., MALEFYT, R.W., COFFMAN, R.L., O'GARRA, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**.V.19, p.683-765, 2001.

MOVAT, H.Z., CYBULSKY, M.I., COLDITZ, I.G., CHAN, M.K., DINARELLO, C.A. Acute inflammation in gram-negative infection: endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor, and neutrophils. **Fed Proc**. V.46, n.1, p.97-104, 1987.

MUNFORD, R. S., VARLEY, A. W. Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to gram-negative bacteria. **PLoS Pathogens**.V.2, n.6, p.467-471, 2006.

MUZIO, M., POLENTARUTTI, N., BOSISIO, D., PRAHLADAN, M.K., MANTOVANI, A. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. **J Leukoc Biol**.V.67, n.4, p.450-6, 2000.

NEWTON, K., STRASSER, A. Caspases signal not only apoptosis but also antigen-induced activation in cells of the immune system. **Genes Dev**. V.17, n.7, p.819-825, 2003.

OBERHOLZER, C., OBERHOLZER, A., BAHJAT, F.R., MINTER, R., TANNAHILL, C., ABOUHAMZE, A., LAFACE, D., HUTCHINS, B., CLARE-SALZLER, M.J., MOLDAWER, L.L. Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. **Proc Natl Acad Sci**. V.98, n.20, p.11503-11508, 2001.

OBERHOLZER, C., OBERHOLZER, A., CLARE-SALZLER, M., MOLDAWER, L. L. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. **FASEB J.**V.15, p.879–892, 2001.

O'SULLIVAN, A.W., WANG, J.H., REDMOND, H.P. NF-kappaB and p38 MAPK inhibition improve survival in endotoxin shock and in a cecal ligation and puncture model of sepsis in combination with antibiotic therapy. **J Surg Res.** V.152, n.1, p.46–53, 2009.

PANG, Q., DOU, L., PAN, X., ZENG, S., HE, J., XU, W., ZENG, Y. Methylene chloride protects against cecal ligation and puncture-induced acute lung injury by modulating inflammatory mediators. **International Immunopharmacology.** V.10, n.8, p.929–932, n.8, 2010.

PÉREZ, C.C., FONCEA, M.A.E. Shock séptico. **Anales de cuidados intensivos.** V.7, p.1–50, 2000.

PERFETTINI, J. L., KROEMER, G. Caspase activation is not death. **Nature Immunol.** V.4, p.308–310, 2003.

POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M.Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B., BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science.** V.282, n.5396, p.2085–8, 1998.

QIU, G., WANG, C., SMITH, R., HARRISON, K., YIN, K. Role of IFN-gamma in bacterial containment in a model of intra-abdominal sepsis. **Shock.** V.16, n.6, p.425–9, 2001.

RAMNATH, R.D., NG, S.W., GUGLIELMOTTIB, A., BHATIA, M. Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. **International Immunopharmacology.** V.8, n.8, p.810–818, 2008.

RANGEL-FRAUSTO, M.S. Sepsis: still going strong. **Arch Med Res.** V.36, n.6, p.672–81. 2005.

REMICK, D.G., LOWRY, S.F., MOLDAWER, L.L. IL-8 in septic shock, endotoxemia and after il-1 administration. **J Immunol.** V.146, n.10, p. 3478–3482, 1991.

REMICK, D.G., NEWCOMB, D.E., BOLGOS, G.L., CALL, D.R. Comparison of the Mortality and Inflammatory Response of Two Models of Sepsis: Lipopolysaccharide Vs. Cecal Ligation and Puncture. **Shock.** V.13, n.2, p.110–116, 2000.

REMICK, D.G., WARD, P.A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. **Shock.** V.24, p.7–11, 2005.

RIEDEMANN, N. C., GUO, R. F., WARD, P. A. The enigma of sepsis. **J Clin Invest.** V.112, n.4, p.460–467, 2003.

RITTER, C., ANDRADES, M.E., REINKE, A., MENNA-BARRETO, S., MOREIRA, J.C., DAL-PIZZOL, F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Crit Care Med.**V.32, n.2, p.342-9, 2004.

RITTIRSCH, D., HUBER-LANG, M.S., FLIERL, M.A., AWARD, P. Immunodesign of experimental sepsis by cecalligation and puncture. **Nature protocols.** V.4, n.1, p.31-36, 2009.

ROCHA, C.S. Obtenção do líofilo de *Zymomonas mobilis* (Lindner) DAUFPE 199 e determinação de sua atividade bactericida frente diferentes cepas de *Escherichia coli*. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais)**. Universidade Federal de Pernambuco. 2003.

ROMAN, R.M., WENDLAND, A.E., CARISI ANNE POLANCZYK, C.A. Mieloperoxidase e Doença Arterial Coronariana: da Pesquisa à Prática Clínica. **Arq Bras Cardiol.**V.91, n.1, p.12-19, 2007.

ROSENBERG, H.F., GALLIN, J.I. Inflammation: Mechanistic basis of immunology. In: Paul, W.E., editor. **Fundamental Immunology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1998.

RUANGLEK, V., MANEEWATTHANA, D., TRIPETCHKUL, S. Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry.**V.41, p.1432-1437, 2006.

RUDIGER, A., STOTZ, M., SINGER, M. Cellular processes in sepsis. **Swiss Med Wkly.**V.138, p.629-34, 2008.

SAKAMOTO, I., IGARASHI, M., KIMURA, K., TAKAGI, A., MIWA, T., KOGA, Y., Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. **J Antimicrob Chemother.** V.47, n.5, 709–710, 2001.

SALES JÚNIOR, J.A., DAVID, C.M., HATUM, R., SOUZA, P.C.S.P., JAPIASSÚ, A., PINHEIRO, C.T.S., FRIEDMAN, G., SILVA, O.B., DIAS, M.D., KOTERBA, E., DIAS, F.S., PIRAS, C., LUIZ, R.R. Sepsis Brasil: Estudo epidemiológico da sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **Revista Brasileira Terapia Intensiva.** V. 18, n.1, p.9-17, 2001.

SALMINEN, S., BOULEY, C., BOUTRON-RUAULT, M.C. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Br J Nutr.**V.80, n.1, p.147–71, 1998.

SANDOR, F., BUC, M. Toll like receptors. I. Structure, function and their ligands. **Pholia Biol (Praha).** V.51, n.5, p.148-56, 2005.

SANDS, K.E., BATES, D.W., LANKEN, P.N., GRAMAN, P.S., HIBBERD, P.L., KAHN, K.L., PARSONNET, J., PANZER, R., ORAV, E.J., SNYDMAN, D.R. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic medical center consortium sepsis project working group. **JAMA.**V.278, n.3, p.234-240, 1997.

SANTOS, J.F. M., VASCONCELOS, J.F.N., MONTENEGRO, S.M.L., AZEVEDO-XIMENES, E.C.P. The effect of *Zymomonas mobilis* culture on experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Rev Soc Bras Med Trop**. V.7, n.6, p.502-504, 2004.

SANTOS, J.F.M. Avaliação do efeito imunoestimulante da cultura de *Zymomonas mobilis* através da dosagem de citocinas humanas e de sua ação frente a infecção esquistossomótica experimental. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco. 2002.

SARTOR, R.B. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. **Current Opinion in Gastroenterology**. V. 21, n.1, p.44-50, 2005.

SATO, M., SANO, H., IWAKI, D., KUDO, K., KONISHI, M., TAKAHASHI, H., TAKAHASHI, T., IMAIZUMI, H., ASAI, Y., KUROKI, Y. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. **J Immunol**. V.171, n.1, p.417-25, 2003.

SCHUMANN, R.R., LEONG, S.R., FLAGGS, G.W., GRAY, P.W., WRIGHT, S.D., MATHISON, J.C., TOBIAS, P.S., ULEVITCH, R.J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. **Science**. V.249, n.4975, p.1429-31, 1990.

SCHWANDNER, R., DZIARSKI, R., WESCHE, H., ROTHE, M., KIRSCHNING, C.J. Peptidoglycan and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. **J Biol Chem**. V.274, p.17406-9, 1999.

SCHWARTZ, L.M., OSBORNE, B.A. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. **Immunol Today**. V.14, n.12, p.582, 1993.

SCUMPIA, P. O., MCAULIFFE, P. F. KERRI, O'MALLEY, A., UNGARO, R. UCHIDA, T., MATSUMOTO, T., REMICK, D. R., CLARE-SALZLER, M. J., MOLDAWER, L., EFRON, P. A.. CD11c⁺ Dendritic Cells Are Required for Survival in Murine Polymicrobial Sepsis. **J Immunol**. V.175, n.5, p.3282-3286, 2005.

SEKI, S., HABU, Y., KAWAMURA, T., TAKEDA, K., DOBASHI, H., OHKAWA, T., HIRAIDE, H. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag⁺ T cells in T helper 1 immune responses. **Immunol Rev**. V.174, p.35-46, 2000.

SENA, J.I.N. L-alanil-glutamina, ômega-6 e ômega-3 na resposta metabólica e no estresse oxidativo em ratos submetidos ao trauma e sepse. **Tese (Doutorado em Cirurgia)**. Universidade Federal do Ceará. 2005.

SERGIO, L., ZANOTTI-CAVAZZONI, ROY D. GOLDFARB, Animal Models of Sepsis. **Crit Care Clin**. V.25, n.4, p.703-719, 2009.

SILVA, E., PEDRO, M.A, SOGAYAR, A.C.B., MOHOVIC, T., SILVA, C.L.O., JANISZEWSKI, CAL, R.G.R., SOUSA, E.F., ABE, T.P., ANDRADE, J., MATOS, J.D., REZENDE, E., ASSUNÇÃO, AVEZUM, A., ROCHA, P.C.S., MATOS, G.F.J., BENTO, A.M., CORRÊA, A.D., VIEIRA, P.C.B., ELIAS KNOBEL, E. - Brazilian

Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**. V.8, n.4, p.251-260, 2004.

SOGAYAR, A.M.C., MACHADO, F. R., REA-NETO, A., DORNAS, A., GRION, C. M.C., LOBO, S.M. A., TURA, B.R., SILVA, C.L.O., CAL, R.G.R., BEER, IDAL., MICHELIS, V. J.R., SAFI, JORGE, J.R., KAYATH, M., SILVA, E., for the Costs Study Group - Latin American Sepsis Institute. A Multicentre, Prospective Study to Evaluate Costs of Septic Patients in Brazilian Intensive Care Units. **Pharmacoeconomics**. V.26, n.5, p.425-434, 2008.

SOUZA, C., SOUZA, L.A.G. Colpitis and vulvovaginitis treatment using *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. **Rev Inst Antib**. V.13, n.10, p.35-87, 1973.

SPAHN, T.W., KUCHARZIK, T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and gut organs. **Gut**. v.53, p.456–465, 2004.

SPEYER, C.L., GAO, H., RANCILIO, N.J., NEFF, T.A., HUFFNAGLE, G.B., SARMA, J.V., WARD, P.A. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. **Am J Pathol**. V.165, n.6, p.2187-96, 2004.

SULLIVAN, A., NORD, C.E. The place of probiotics in human intestinal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**. V.20, p.313-319, 2002.

SURAWICZ, C.M., ELMER, G.W., SPLEEMAN, P. M.C., FARLAND, L.V., CHINN J., VAN BELLE, G. Prevention of antibiotic associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. **Gastroenterology**. V.96, p.981–8, 1989.

SWINGS, S., DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriol Rev**. V.41, n.1, p.1-46, 1977.

TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., AND AKIRA, S. Cutting edge: TLR2- deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. **J Immunol**. V.165, p.5392–5396, 2000.

TAKEUCHI, O., KAWAI, T., MÜHLRADT, P.F., MORR, M., RADOLF, J.D., ZYCHLINSKY, A., TAKEDA, K., AKIRA S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. **Int Immunol**. V.13, n.7, p.933-40, 2001.

TAVARES-MURTA, B.M., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. The intravenous administration of tumor necrosis factor, interleukin 8 and macrophage- neutrophil derived chemotact factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **Br J Pharmacol**. V.24, p.1369-1374, 1998.

THAM, A. C. L., LAM B. K. W., RAJAJENDRAM A, R., CHEAH A. Y. K., SULAIMAN, A. M. R., NORDIN, H., LAJIS, B. C., KIM, B. M. K., DAUD, A. The effects of a synthetic curcuminoid analogue, 2,6-bis-(4-hydroxyl-3 methoxybenzylidene)cyclohexanone on pro-inflammatory signaling pathways and CLP induced lethal sepsis in mice. **European Journal of Pharmacology**. V.652, n.1-3, p.136–144, 2011.

TOMA, M. M., KALNENIEKS, U., BERZINS, A., VIGANTS, A., RIKMANIS, M., VIESTURS, U. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry**. V.38, n.9, p.1347-1350, 2003.

TORPY, D. J., TSIGOS, C.A.J., LOTSIKAS, R., DEFENSOR, G.P., CHROUSOS, D.A., PAPANICOLAOU. Acute and delayed effects of a single-dose injection of interleukin 6 on thyroid function in healthy humans. **Metabolism**. V.47, n.10, p.1289-1293, 1998.

TORRES, K. Determinação da tolerância da cultura de *Zymomonas mobilis* aos sais biliares. **Monografia Curso em Ciências Biomédicas** – Universidade Federal de Pernambuco. 2003.

TORRES-DUEÑAS, D. Papel do peroxinitrito na migração de neutrófilos para o foco infeccioso e na disfunção cardiovascular durante a sepse grave. **Tese (Doutorado em Ciências)**. Universidade de São Paulo. 2006.

TORRES-DUEÑAS, D., BENJAMIM, C.F., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. 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**. V.5, n.3, p.267-276, 2006.

TORRES-DUEÑAS, D., CELES, M.R.N., FREITAS A., ALVES-FILHO, J.C., SPILLER, F., DAL-SECCO, D., DALTO, V.F., ROSSI, M.A., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. **British Journal of Pharmacology**. V.152, p.341–352, 2007.

UENO, T., IKEDA, T., K IKEDA, K., TANIUCHI, H., SUDA, S., YEUNG, M.Y., MATSUNO, N. HMGB-1 as a Useful Prognostic Biomarker in Sepsis-Induced Organ Failure in Patients Undergoing PMX-DHP. **J Surg Res**. V.171, n.1, p.183-90, 2009.

VAN DER POLL, T., MARCHANT, A., BUURMAN, W.A., BERMAN, L., KEOGH, C.V., LAZARUS, D.D., NGUYEN, L., GOLDMAN, M., MOLDAWER, L.L., LOWRY, S.F. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **The Journal of Immunology**. V.155, n.11, p.5397-5401, 1995.

VAN OVERVELD, F.J., JORENS, G., RAMPART, M., DE BACKER, W. VERMEIRE, P.A. Tumour necrosis factor stimulates human skin mast cells to release histamine and tryptase. **Clin Exp Allergy**. V.21, n.6, p.711-4, 1991.

VAN ZEE, K.J., DEFORGE, L.E., FISCHER, E., MARANO, M.A., KENNEY, J.S., REMICK, D.G., LOWRY, S.F., MOLDAWER, L.L. IL-8 in septic shock, endotoxemia and after il-1 administration. **J Immunol**. V.146, n.10, p.3478-3482, 1991.

VAUGHAN, E. E., MOLLET, B. DEVOS, W. M. Functionality of probiotics and intestinal *lactobacilli*: light in the intestinal tract tunnel. **Current Opinion in Biotechnology**. V.10, n.5, p.505-510, 1999.

VERMONT, C.L., HAZELZET, J.A., KLEIJN, E.D., DOBBELSTEEN, G.P.V.D., GROOT, R. CC and CXC chemokine levels in children with meningococcal sepsis accurately predict mortality and disease severity. **Crit Care**. V.10,n.1, p.33, 2006.

VICENT, J. L., MARTINEZ, E. O., SILVA, E. Evolving concepts in sepsis definitions.**Crit Care Clin**.V.5, n.4, p.665-75, 2009.

VICENT, J.L., CARLET, J., OPAL, S.M. Sepsis: the magnitude of the problem, Theseptis text, 1ª edição, Bonston.**Kluwer Academic Publishers**.P.1- 10, 2002.

VOLL, R.E., HERRMANN, M., ROTH, E.A., STACH, C., KALDEN, J.R., GIRKONTAITE, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells.**Nature Medicine**.V.390, n.6658, p.350–351,1997.

VYAS, D., JAVADI, P., DIPASCO, P. J. Early antibiotic administration but not antibody therapy directed against IL-6 improves survival in septic mice predicted to die on basis of high IL-6 levels. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. V.289, n.4, p.1048-1053, 2005.

WAJANT, H., PFIZENMAIER, K., SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ**. V.10, n.1, p.45-65, 2003.

WALLEY, K.R., LUKACS, N.W., STANDIFORD, T.J., STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infect Immun**. V.64, n.11, p.4733-8, 1996.

WANG, H., LIAO, H., OCHANI, M., JUSTINIANI, M., LIN, X., YANG, L., AL-ABED, Y., METZ, C., MILLER, E.J., TRACEY, K.J., ULLOA, L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. **Nature Medicine**.V.10, p.1216-21, 2004.

WANICK, M.C., SILVA, E.C. Novas observações sobre o emprego de *Zymomonas mobilis* var.*recifensis* em infecções por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis*.**Rev IstAntib**.V.11, p.69-71, 1971.

WATSON, R.S., CARCILLO, J.A., LINDE-ZWIRBLE, W.T., CLERMONT, G., LIDICKER, J., ANGUS, D.C.The epidemiology of severe sepsis in children in the United States.**Am J Respir Crit Care Med**.V.167, n.5, p.695–701, 2003.

WEBER, S.U., SCHEWE, J.C., LEHMANN, L.E., MULLER, S., BOOK, M., KLASCHIK, S., HOEFT, A., STUBER, F. Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis.**Crit Care**.V.12, n.5, p.1-10, 2008.

WESCHE, D.E., LOMAS-NEIRA, J.L., PERL, M., CHUNG, C., AYALA, A.Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock.**Journal of leukocyte biology**.V.78, p.325-337, 2005.

WICHTERMAN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal.**J Surg Res**.V.29, n.2, p189-201, 1980.

WILKINS, M.R. Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Biomass and bioenergy**. V. 33, n.3, p.538-541, 2009.

YAN, J. J., JUNG, J. S., LEE, J. E., LEE, J., HUH, S. O., KIM, H. S., JUNG, K. C., CHO, J. Y., NAM, J. S., SUH, H. W. Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. **Nat. Med.** v.10, p.161–167, 2004.

YANG, H., WANG, H., CZURA, C.J., TRACEY, K.J. The cytokine activity of HMGB1. **J Leukoc Biol.** V.78, n.1, p.1-8, 2005.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**. V.19, n.2, p.107-117, 1996.

ZIKMANIS, P., SHAKIROVA, L., AUZINA, L., ANDERSONE, I. Hydrophobicity of bacteria *Zymomonas mobilis* under varied environmental conditions. **Process Biochemistry**. V.42, n.4, p.745–750, 2007.

ZISMAN, D.A., KUNKEL, S.L., RM STRIETER, R.M., WC TSAI, K BUCKNELL, J WILKOWSKI, AND TJ STANDIFORD. MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. **J Clin Invest**. V.99, n.12, p.2832-6, 1997.

