

Efeito da solução hipertônica de NaCl 7,5% na resposta inflamatória em modelo de choque hipovolêmico*

Effects of hypertonic solution (NaCl 7,5%) on the inflammatory response in an experimental model of hemorrhagic shock

Thadeu Rangel Fernandes⁽¹⁾, Vera Pontieri⁽²⁾, Ana Lochabel Moretti⁽²⁾, Daniella Oxer⁽²⁾, Fatima Abatepaulo⁽²⁾, Elnara Maria Negri⁽²⁾, Irineu Tadeu Velasco⁽²⁾, Heraldo Possolo de Souza⁽³⁾

Fernandes TR, Pontieri V, Moretti AL, Oxer D, Abatepaulo F, Negri EM, Velasco IT, Souza HP de. Efeito da solução hipertônica de NaCl 7,5% na resposta inflamatória em modelo de choque hipovolêmico. Rev Med (São Paulo). 2006 jan.-mar.;85(1):3-10.

RESUMO: A solução hipertônica de cloreto de sódio 7,5% (SSH) é eficaz em restaurar os parâmetros hemodinâmicos e reduzir a inflamação em modelos experimentais de choque hemorrágico. Assim, foi nosso objetivo investigar a ação da SSH sobre os mecanismos envolvidos na lesão de isquemia e reperfusão (I/R) em um modelo de choque hemorrágico controlado. Ratos Wistar (280-350 g) foram submetidos à hemorragia controlada, mantendo-se a pressão arterial média em 40 mmHg por 1 h. Após esse período, os animais foram randomizados e receberam SSH (4 ml/kg) ou solução salina isotônica (SSI-34 ml/kg). Não foram observadas diferenças na resposta hemodinâmica nos dois grupos. Também não foram observadas diferenças na geração espécies reativas de oxigênio (medida indiretamente pela concentração de malondialdeído) ou das citocinas IL-6 e IL-10 (medidas por ELISA). A análise histológica qualitativa dos pulmões mostrou que os animais do grupo SSH apresentaram um menor influxo tecidual de neutrófilos. Esses animais também mostraram maior expressão de proteínas do choque térmico 70 (HSP70). Assim, concluímos que o tratamento do choque hemorrágico com SSH pode diminuir o processo inflamatório pulmonar e aumentar a proteção celular, devido ao aumento da expressão de HSP70.

DESCRITORES: Proteínas do choque térmico/análise; Ativação de neutrófilos; Citocinas/análise; Estresse oxidativo/efeitos de drogas; Traumatismo por reperfusão; Choque.

* Trabalho científico – área básica. COMU. Laboratório de Investigação Médica 51 (LIM-51). Disciplina de Emergências Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo.

⁽¹⁾ Acadêmico do 4º ano do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

⁽²⁾ Colaboradores.

⁽³⁾ Orientador. Prof. Doutor da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Thadeu Rezende Rangel Fernandes. Av. Nova Cantareira, 20. Ap. 93. CEP: 02330-000. São Paulo, SP. e-mail: thadeu91@terra.com.br

A isquemia tecidual leva à morte celular por necrose, devido à deprivação dos substratos energéticos. É necessário, portanto, reverter a isquemia seja ela regional (por exemplo, através da angioplastia ou trombólise no infarto agudo do miocárdio) ou global (por exemplo, na parada cardíaco-respiratória ou no choque). Paradoxalmente, a reperfusão traz para o tecido reperfundido uma nova ameaça. Uma vez que a isquemia tenha sido por período não muito longo (o tempo que a célula suporta a isquemia é diferente para cada tecido), no momento do restabelecimento do fluxo sanguíneo existem células viáveis nas quais a reperfusão desencadeia uma série de eventos intracelulares que podem lesar irreversivelmente essas células, levando à morte por necrose, ou mais comumente, por apoptose.

São múltiplos os mecanismos descritos como responsáveis pela lesão celular na isquemia-reperfusão: produção de espécies reativas de oxigênio no momento da reperfusão^{13,40}, aumento da geração de óxido nítrico, com conseqüente geração do potente oxidante peroxinitrito³⁶, disfunção endotelial³⁵, com diminuição da atividade da óxido nítrico sintase endotelial¹⁴ e aumento da expressão de moléculas de adesão¹⁵, alterações do metabolismo do cálcio^{20,31}, infiltração de células do sistema imune no tecido reperfundido, levando à lesão celular pelo processo inflamatório local^{1,11}.

Choque hemorrágico é a principal e mais dramática causa de choque hipovolêmico³⁰. O objetivo principal do tratamento do choque hemorrágico é restabelecer uma adequada perfusão tecidual. Tal objetivo é alcançado através de manobras que impeçam que o sangramento continue e do restabelecimento do volume circulante, através da administração de fluidos intravasculares. A conduta padrão para o tratamento inicial do paciente traumatizado que se apresenta hipotenso tem sido a ressuscitação agressiva e precoce com grandes quantidades de soluções cristalóides⁷. Como descrito acima, a reperfusão, embora necessária, pode desencadear lesão tecidual.

Descrita inicialmente no início dos anos 80³², a infusão de solução salina hipertônica (NaCl 7,5%, osmolaridade de 2400 mOsm) parece ser uma alternativa atraente para o tratamento do choque hemorrágico. Entre suas vantagens, podemos citar o menor tempo gasto para administração da solução (o que pode ser crucial no tratamento do paciente com sangramento severo), a facilidade de estocagem e a menor incidência de complicações da sobrecarga de volume (por exemplo, edema agudo de pulmão) que pode ocorrer no tratamento com grandes quantidades de solução isotônica.

Em modelos experimentais, quando comparados como quantidade de sódio total

administrado, a solução salina hipertônica (SSH) mostrou-se tão ou mais eficaz que solução salina isotônica em restaurar os parâmetros hemodinâmicos, pressão arterial e perfusão tecidual^{28,33}.

Mais recentemente, em modelos experimentais de choque hemorrágico, a ressuscitação com o uso de solução salina hipertônica mostrou que pode também alterar favoravelmente a lesão de isquemia-reperfusão^{22,23,27}.

Muitos desses efeitos, entretanto, foram descritos na evolução tardia do quadro. Assim, nosso objetivo foi investigar, em modelo animal de choque hemorrágico controlado, a ação da solução salina hipertônica nos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da lesão de isquemia-reperfusão.

MÉTODOS

Protocolo Experimental

Ratos machos Wistar, pesando entre 280 a 350 gramas foram anestesiados com pentobarbital. A artéria e a veia femorais esquerdas foram dissecadas e canuladas com cateteres de tygon, identificados, preenchidos com solução fisiológica de NaCl a 0,9% e fechados em sua porção distal. Os cateteres foram passados pela região subcutânea inguinal até a região cervical posterior, onde foram exteriorizados. Vinte e quatro horas após a canulação dos vasos femorais, 0,1mL de solução de heparina 500UI foi injetada pela cânula da artéria e os animais foram colocados em uma gaiola menor onde foram mantidos por alguns minutos para se adequarem ao ambiente. Uma extensão liga a cânula da artéria a um transdutor de pressão arterial conectado ao Biopac Systems Inc. onde a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram monitoradas continuamente.

Após o tempo de adaptação, os animais foram submetidos a sangramento de 3,1 mL/100g, pela mesma artéria femoral, dividido em oito episódios por um período de trinta minutos. Os animais permaneceram em choque por um período de trinta minutos. Após esse tempo inicia-se o tratamento. Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo SSH: tratamento com infusão i.v. de 4 mL/kg de volume de salina hipertônica (NaCl-7,5%);

Grupo SSI: tratamento com infusão i.v. de 34 mL/kg de volume de solução fisiológica (NaCl-0,9%).

Foram colhidas amostras de sangue total: antes do início do sangramento, ao final dos 30 minutos de choque, imediatamente após o tratamento, 1 e 2 horas após o final do tratamento.

Ao final das 2 horas, os animais foram sacrificados com dose letal de pentobarbital e foram colhidos os pulmões e o fígado para análises posteriores.

Análise histológica

Após o sacrifício, o animal foi perfundido com solução de formalina 4% pela aorta e ventrículo direito. Os pulmões foram insuflados cuidadosamente próximo à capacidade residual funcional (CRF) e então a traquéia foi amarrada e os espécimes foram fixados em formaldeído 10%.

A seguir, foram obtidos cortes de 5µm de espessura, submetidos à coloração pelo método da hematoxilina-eosina (HE), para a análise histoarquitetural do órgão, em que as imagens foram analisadas num microscópio Leica, usando software específico.

Dosagem de malondialdeído

Os tecidos foram homogenizados em KCl 1,15% (~1000g/ml) e, em seguida, transferidos para tubos secos e centrifugados a 14.000g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos recipientes.

Os homogenatos teciduais (100 µl) foram então adicionados aos demais reagentes (ácido acético 20%, 750 µl - SDS 8,1%, 100 µl - água destilada, 300 µl - TBA 0,8%, 750 µl), colocados em tubos de vidro e incubados a 95°C por 60 minutos. A solução foi finalmente transferida para placas de leituras e medidas a uma densidade óptica de 532nm num aparelho Tecan Genius.

Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas séricas foi feita por ELISA com anticorpos de captura e de detecção específicos para IL-10 e IL-6 (R&D Systems). A concentração de cada citocina nos sobrenadantes foi calculada com base na equação da reta de regressão linear da curva padrão obtida com citocinas recombinantes, de acordo com as instruções do fabricante do kit. A leitura foi feita num aparelho Tecan Genius.

Western Blotting

Para a obtenção do extrato protéico contendo as proteínas de interesse, os tecidos foram homogenizados em tratadas com tampão de lise (RIPA buffer- 0,1% de SDS, 1,0% de IGEPAL, 1,0% de oxalato de sódio, 10 mM de Tris.HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl). As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante retirado para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford. Em seguida, as proteínas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema de transferência semi-seca. As proteínas de interesse (HSP70, 90 e 110) foram detectadas com

anticorpos monoclonais específicos (BD Pharmingen) e a revelação foi feita por quimioluminescência. A quantificação das bandas detectadas foi feita por densitometria, usando o software específico Un-Scan-It (Silk Scientific Corporation)

Estatística

Os resultados foram analisados com testes estatísticos paramétricos do tipo teste t de Student (duas séries de dados) ou análise de variância (ANOVA, mais de duas séries de dados). Foram considerados como significativos resultados de testes com $p = 0,05$.

RESULTADOS

Hemodinâmica

Foram utilizados 10 ratos em cada grupo. A Pressão Arterial Média (PAM) antes de ser retirado o sangue era igual em ambos os grupos. Foi retirada quantidade de sangue suficiente para que a PAM chegasse a aproximadamente 40 mmHg. O volume sangrado de ambos os grupos foi semelhante.

Imediatamente após a reperfusão, o grupo que recebeu SSH apresentava PAM discretamente mais elevada, porém, de maneira não significativa. A PAM não apresentou diferença entre os grupos após 1 hora e se manteve estável, até duas horas após o final do tratamento.

Na Tabela 1 são mostrados os dados de PAM de ambos os grupos de animais. Não houve diferença significativa entre os animais que receberam SSH ou SSI.

Tabela 1. Pressão arterial média nos animais submetidos a sangramento controlado.

	Basal	Final do Choque	Final da Reperfusão
SSI	101,4 ± 1,7	40,1 ± 1,6	86,9 ± 2,0
SSH	104,5 ± 1,4	39,7 ± 1,7	97,3 ± 2,7

Valores em mmHg, representando média ± EPM; Não houve diferença significativa entre os grupos.

Análise histológica

A análise qualitativa das amostras dos três grupos de estudo (controle, salina e hipertônica) à microscopia óptica (fotos A, B e C), observamos que o grupo no qual foi utilizado solução hipertônica, apresentou um menor influxo tecidual de neutrófilos, que por vezes se dispunha em focos isolados, diferentemente do grupo que recebeu salina, o qual apresentou um infiltrado neutrofílico mais uniforme nos septos alveolares.

Tais alterações foram analisadas qualitativamente, ou seja, sem quantificação morfométrica, mas apenas através da análise visual do órgão.

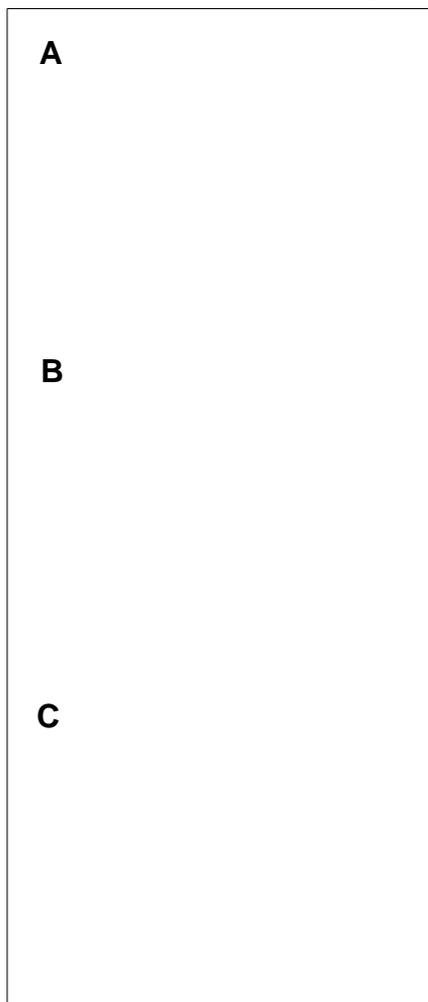


Figura 1. Animais que receberam SSH (Painel C) apresentam um menor influxo tecidual de neutrófilos, que por vezes se dispunha em focos isolados, diferentemente do grupo que recebeu salina (B), o qual apresentou um infiltrado neutrofílico mais uniforme nos septos alveolares. Ambos os grupos, porém, apresentam processo inflamatório ausente nos animais controle (A). Fotos representativas de pelo menos 3 animais em cada grupo. Aumento 200x.

Dosagem de malondialdeído

Um dos principais mecanismos pelos quais a lesão de isquemia-reperfusão exerce seus efeitos deletérios é o estresse oxidativo. A reperfusão gera um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, derivadas da respiração mitocondrial e outras fontes celulares ocasionando lesão oxidativa de proteínas e lipídeos celulares.

Assim, foram realizados experimentos para se determinar se a reperfusão com solução salina

hipertônica modifica de alguma maneira o estresse oxidativo. Como as espécies reativas de oxigênio isoladas são de difícil detecção, devido a sua alta reatividade, foi mensurado o malondialdeído, produto de peroxidação lipídica, mais estável.

Na situação basal, a dosagem de MDA é similar em ambos os grupos. Ocorre uma diminuição do MDA durante o choque e imediatamente após a reperfusão inicia-se um aumento na geração de MDA, que permanece elevado até duas horas após a reperfusão (Figuras 2 e 3). Também não foram detectadas alterações na geração de MDA nos homogenatos de pulmões e fígados, colhidos 2 horas após a reperfusão.

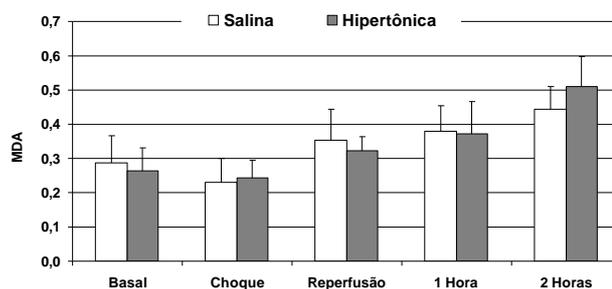


Figura 2. Após a reperfusão, ocorre um aumento progressivo da geração de espécies reativas de oxigênio, até duas horas após o choque. Não há diferença entre os grupos que foram reperfundidos com SSI ou SSH. Barras representam média ± EPM. n = 6 em cada grupo. * = p<0,05 comparado ao final do choque.

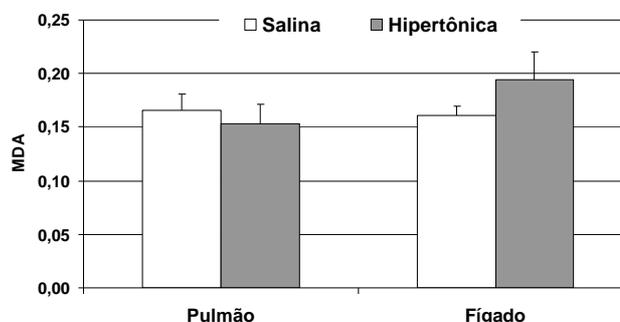


Figura 3. Os fígados e pulmões dos animais que sofreram choque hemorrágico foram retirados duas horas após a reperfusão e o MDA dosado nos homogenatos. Não há diferença entre os grupos que foram reperfundidos com SSI ou SSH. Barras representam média ± EPM. n = 6 em cada grupo. * = p<0,05 comparado ao final do choque.

Assim, não houve diferença significativa na geração de MDA entre os grupos tratados com SSI ou SSH, sugerindo que a solução hipertônica não altera a geração de espécies reativas de oxigênio, seja no plasma, ou nos tecidos, durante a reperfusão dos ratos em choque hemorrágico.

Citocinas

A reperfusão gera um processo inflamatório, caracterizado por infiltrado celular no tecido previamente isquemiado. Essas células geram citocinas, que controlam a migração e atividades de outras células do sistema imune.

Com o objetivo de determinar se a reperfusão com solução salina hipertônica poderia modificar a resposta inflamatória, foram dosadas citocinas plasmáticas nos animais submetidos a choque hemorrágico.

Tanto IL-16 quanto IL-10 apresentam concentrações plasmáticas basais baixas. Ocorre aumento de todas as citocinas durante o sangramento controlado, principalmente em IL-6.

Após a reperfusão, entretanto, é que ocorre um grande aumento na concentração sérica das citocinas (Figuras 4 e 5). Esse aumento é semelhante entre os animais reperfundidos com SSI ou SSH.

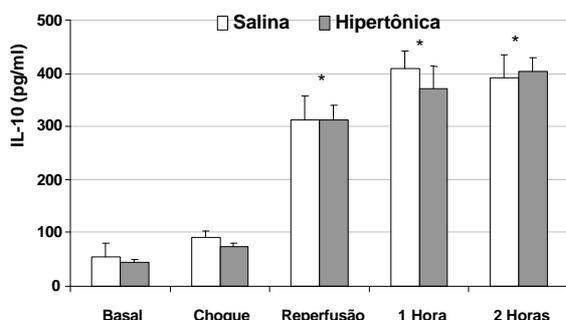


Figura 4. Não há diferença entre os grupos na sua concentração basal da citocina IL-10. Ao final do sangramento (Choque), ocorre um discreto aumento na sua concentração, não significativa. Após a reperfusão, porém, ocorre um grande aumento na concentração sérica de IL-10. Não há, porém, diferença entre os grupos reperfundidos com SSI ou SSH. Barras representam média \pm EPM. $n = 6$ em cada grupo. * = $p < 0,05$ comparado ao basal e final do choque, para ambos os grupos.

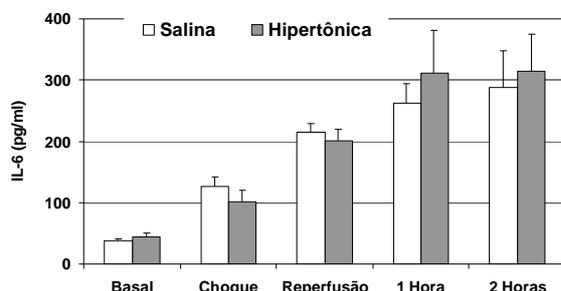


Figura 5. Não há diferença entre os grupos na sua concentração basal da citocina IL-6. Ao final do sangramento (Choque), já é detectável um aumento na sua concentração, que se exacerba após a reperfusão. Não há, porém, diferença entre os grupos reperfundidos com SSI ou SSH. Barras representam média \pm EPM. $n = 6$ em cada grupo. * = $p < 0,05$ comparado ao basal e final do choque, para ambos os grupos.

Assim, o tratamento com solução salina hipertônica não altera o aumento na produção de citocinas causada pela reperfusão após isquemia.

Expressão de HSPs

As proteínas do choque térmico "heat shock proteins" (HSPs) são chaperonas moleculares cuja síntese é induzida em diversas situações de estresse celular²⁶. Aumento na expressão de HSPs tem sido descrito em situações de isquemia-reperfusão regional¹⁰ ou global¹⁸.

Assim, investigamos, em nosso modelo de choque hemorrágico, se a reperfusão com SSH poderia alterar a expressão das HSPs 70, 90 e 110.

Inicialmente, observamos que a lesão de isquemia-reperfusão aumenta, no período (2 horas) e órgãos estudados (pulmões e fígado) a expressão da HSP70. A expressão das HSPs 90 e 110 era mais baixa em ambos os órgãos e foi pouco afetada pela isquemia e reperfusão com qualquer uma das duas soluções usadas.

A expressão de HSP70 foi detectada por imunoblot e quantificada por densitometria. Houve um aumento na expressão das HSP70 quando era usada SSH para reperfusão após choque hemorrágico (Figura 6). Esse aumento foi mais evidente e significativo no pulmão que no fígado.

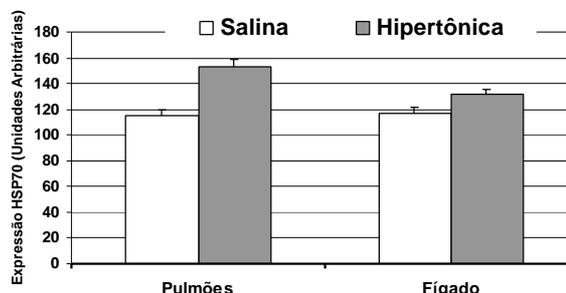


Figura 6. A expressão da HSP70 foi detectada em homogenatos de pulmões e fígados por imunoblot e quantificada por densitometria. Ocorre um aumento discreto na expressão da HSP7 nos pulmões e fígados de animais reperfundidos com SSH após choque hemorrágico, a qual é significativa somente nos pulmões. Barras representam média \pm EPM. $N = 6$ em cada grupo. $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina.

DISCUSSÃO

Reposição vigorosa de solução salina ainda é o procedimento padrão para tratamento do choque hemorrágico. Embora necessária, essa prática desencadeia a lesão de isquemia-reperfusão, responsável por disfunção orgânica e algumas das complicações observadas após o tratamento iniciado do choque. Por isso, é desejável o desenvolvimento de estratégias

que sejam tão eficazes quanto a reposição volêmica vigorosa e que possam de alguma maneira evitar ou atenuar a I/R²⁹.

Entre as múltiplas terapêuticas testadas para diminuir a lesão de isquemia-reperfusão, como, por exemplo, o uso de antioxidantes no momento do restabelecimento do fluxo⁸, as mais promissoras são aquelas que demonstram potencial de diminuir o processo inflamatório. Em modelos experimentais de I/R, a solução salina hipertônica exibe esse potencial anti-inflamatório. Entre seus efeitos já descritos, a ressuscitação com solução salina hipertônica induz inibição do "burst" respiratório em neutrófilos³, previne a expressão de moléculas de adesão^{2,9,27} em neutrófilos, aumenta a produção de IL-10 e diminui a de TNF- α em macrófagos de ratos estimulados com LPS²⁵ e altera a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos² e em células endoteliais²⁴.

Entretanto, muitos desses efeitos foram descritos em modelos cujo tempo de observação após o choque era mais longo. Aqui demonstramos que a reperfusão com solução salina hipertônica pode exercer efeitos mais agudos sobre a lesão de I/R.

Inicialmente foi observado que já existe um efeito precoce sobre o processo inflamatório pulmonar nos animais que receberam SSH, quando comparados com animais que receberam SSI. Embora não tenhamos quantificado a infiltração de leucócitos em nosso modelo, existe uma clara diminuição do número de células presentes nos septos alveolares e margeando os vasos pulmonares. Esses dados são compatíveis com os de outros autores, que, em modelo semelhante, descreveram uma menor infiltração de polimorfonucleares e expressão de moléculas de adesão (ICAM-1) nos animais que foram ressuscitados com solução hipertônica³⁸. Dados quantitativos e identificação das células inflamatórias que infiltram o pulmão estão sendo realizados em nosso laboratório.

O estresse oxidativo é um dos mecanismos mais estudados como efetores da lesão de I/R. Múltiplas fontes celulares podem gerar superóxido após a reperfusão, entre elas, a respiração mitocondrial, atividade da xantina oxidase ou da NAD(P)H oxidase¹. Aqui demonstramos que a reperfusão com SSH não altera nem a concentração sérica nem o conteúdo tecidual de malondialdeído.

O método usado mede moléculas modificadas por alterações oxidativas, sendo, portanto, um indicador indireto da geração de radicais livres de oxigênio. Entretanto, é um método largamente usado em outros estudos^{16,21} e apresenta boa correlação com os eventos oxidativos observados nos tecidos. Podemos, assim, concluir que a reperfusão com SSH não altera a produção de espécies reativas de oxigênio desencadeada após isquemia, quando comparada ao uso de SSI.

Embora tenhamos detectado uma menor infiltração de leucócitos nos pulmões de ratos que foram tratados com SSH, não pudemos observar diferenças nas concentrações de citocinas circulantes. Esses dados são semelhantes aos obtidos por outros autores⁶, porém os dados disponíveis sobre citocinas circulantes após I/R dependem muito do modelo utilizado e não são conclusivos¹⁹.

As HSP são uma classe de proteínas altamente conservadas e podem ser agrupadas em famílias: HSP-27, HSP-47, HSP-60, HSP-70, HSP-90 e HSP-110, de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em kD)¹⁷. Em cada família, há diferentes proteínas, por exemplo HSP-72 e HSP-73 no grupo HSP-70 e assim por diante; sendo que os pesos moleculares são similares, mas os padrões de indução e expressão são distintos. Diversos tipos de estresse metabólico, como exposição ao calor, metais pesados, entre outros, são capazes de induzir a síntese destas proteínas. O principal mecanismo de ação das HSP, mediante o qual conferem proteção, seria o de atuarem como chaperonas moleculares, isto é, sem fazer parte da estrutura final de proteínas, evitam interações incorretas entre estas, auxiliam na montagem final das mesmas¹², bem como em sua síntese, dobramento e degradação.

O papel protetor de diversas HSPs tem sido descrito em modelos de isquemia e reperfusão regional^{4,37}. Em modelos de I/R global, o aumento da expressão de HSP70 induzida por drogas (geldanamicina) se mostrou um mecanismo protetor contra a lesão de isquemia e reperfusão após choque hemorrágico.

Aqui, demonstramos que o uso de SSH após choque hemorrágico aumenta a expressão de HSP70, quando comparada com a reperfusão com SSI. O método utilizado (imunoblot, ou Western blotting) é semi-quantitativo, o que é uma limitação importante, porém, não existem descritos na literatura outros métodos sensíveis e específicos o suficiente para detecção quantitativa de HSPs.

Embora novos estudos sejam necessários para se fazer a conexão entre a diminuição do processo inflamatório e o aumento da expressão de HSP70, essa parece ser uma linha promissora de investigação. Pode-se especular que uma maior proteção celular, devida à expressão aumentada de HSP70 pode levar a uma diminuição da morte celular, por necrose ou apoptose, causando, conseqüentemente, um menor processo inflamatório local. Essa hipótese, embora atrativa, ainda necessita confirmação experimental.

Em resumo, demonstramos nesse trabalho que a reperfusão com solução salina hipertônica após choque hemorrágico, quando comparada ao uso de solução salina isotônica leva a uma diminuição do

processo inflamatório pulmonar e a um aumento da expressão de proteínas do choque térmico (HSP70), sem alterar o estresse oxidativo ou citocinas plasmáticas.

Embora estudos clínicos tenham sido realizados, com resultados encorajadores³⁹, a aplicação clínica da solução hipertônica de cloreto de sódio como alternativa para o tratamento do choque hemorrágico ainda não é universalmente aceita⁵. Entretanto, seus

efeitos como modulador da resposta inflamatória presente na lesão de isquemia e reperfusão ainda precisam ser melhor estudados. No momento, as evidências sobre esse efeito imunomodulador da solução hipertônica ainda não são conclusivos¹⁹.

Porém novas evidências do seu mecanismo de ação, como o descrito nesse trabalho, poderão trazer à tona seu potencial no tratamento do choque hemorrágico.

Fernandes TR, Pontieri V, Moretti AL, Ozer D, Abatepaulo F, Negri EM, Velasco IT, Souza HP **de. Effects of hypertonic solution (NaCl 7,5%) on the inflammatory response in an experimental model of hemorrhagic shock.** Rev Med (São Paulo). 2006 jan.-mar.;85(1):3-10.

ABSTRACT: Hypertonic saline solution (HSS - NaCl 7,5%) was shown to restore hemodynamic parameters in hemorrhagic shock and to decrease the inflammation triggered by ischemia-reperfusion injury (I/R). Therefore, our objective was to investigate the effects of HSS on the mechanisms involved in I/R, in an experimental model of controlled hemorrhagic shock. Wistar rats (280-350 g) were submitted to controlled bleeding, keeping the mean arterial pressure around 40 mmHg, for 1 hour. After that, rats were randomized and treated with HSS (4 ml/kg) or normal saline (ISS) (34 ml/kg). There were no differences in hemodynamic parameters between the two groups for at least 2 h after shock. No difference either was observed in reactive oxygen species generation (measured indirectly by malondialdehyde concentration) or cytokines (IL-6 and IL-10) production (measured by ELISA). Qualitative analysis of lung tissue showed a smaller neutrophil infiltrate in animals that received HSS. Also, the animals in the HSS group showed an increased expression of heat shock protein 70 (HSP70). Therefore, we conclude that treatment of hemorrhagic shock with hypertonic saline solution can decrease pulmonary inflammation and increase cellular protection by up-regulating HSP70 expression.

KEYWORDS: Heat-shock proteins/analysis; Reperfusion injury; Cytokines/analysis; Oxidative stress/drugs effects; Neutrophil activation. Shock.

REFERÊNCIAS

1. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. J Surg Res. 2002;105(2):248-58.
2. Angle N, Cabello-Passini R, Hoyt DB, Loomis WH, Shreve A, Namiki S et al. Hypertonic saline infusion: can it regulate human neutrophil function? Shock. 2000;14(5):503-8.
3. Angle N, Hoyt DB, Coimbra R, Liu F, Herdon-Remelius C, Loomis W et al. Hypertonic saline resuscitation diminishes lung injury by suppressing neutrophil activation after hemorrhagic shock. Shock. 1998;9(3):164-70.
4. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. Circ Res. 1998;83(2):117-32.
5. Bunn F, Roberts I, Tasker R, Akpa E. Hypertonic versus near isotonic crystalloid for fluid resuscitation in critically ill patients. Cochrane Database Syst Rev. 2004(3):CD002045.
6. Coimbra R, Junger WG, Hoyt DB, Liu FC, Loomis WH, Evers MF. Hypertonic saline resuscitation restores hemorrhage-induced immunosuppression by decreasing prostaglandin E2 and interleukin-4 production. J Surg Res. 1996;64(2):203-9.
7. Committee T. Advanced trauma life support. Chicago, Ill: American College of Surgeons; 1993. p.75-110.
8. Cryer HG. Therapeutic approaches for clinical ischemia and reperfusion injury. Shock. 1997;8(1):26-32.
9. Deitch EA, Shi HP, Feketeova E, Hauser CJ, Xu DZ. Hypertonic saline resuscitation limits neutrophil activation after trauma-hemorrhagic shock. Shock. 2003;19(4):328-33.
10. Delogu G, Signore M, Mechelli A, Famularo G. Heat shock proteins and their role in heart injury. Curr Opin Crit Care. 2002;8(5):411-6.

11. Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC, Zweier JL. Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(6):H2649-57.
12. Ellis RJ, Hartl FU. Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *Faseb J*. 1996;10(1):20-6.
13. Flaherty JT, Zweier JL. Does lethal myocardial reperfusion injury exist? *J Thromb Thrombolysis*. 1997;4(1):91-3.
14. Giraldez RR, Panda A, Xia Y, Sanders SP, Zweier JL. Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. *J Biol Chem*. 1997;272(34):21420-6.
15. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*. 1999;6(3):167-78.
16. Hasegawa T, Malle E, Farhood A, Jaeschke H. Generation of hypochlorite-modified proteins by neutrophils during ischemia-reperfusion injury in rat liver: attenuation by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(4):G760-7.
17. Jaattela M, Wissing D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann Med*. 1992;24(4):249-58.
18. Kiang JG. Inducible heat shock protein 70 kD and inducible nitric oxide synthase in hemorrhage/resuscitation-induced injury. *Cell Res*. 2004;14(6):450-9.
19. Kolsen-Petersen JA. Immune effect of hypertonic saline: fact or fiction? *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004;48(6):667-78.
20. Kukreja RC, Janin Y. Reperfusion injury: basic concepts and protection strategies. *J Thromb Thrombolysis*. 1997;4(1):7-24.
21. Mabley JG, Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Hasko G, Marton A et al. Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284(1):G138-44.
22. Murao Y, Hoyt DB, Loomis W, Namiki S, Patel N, Wolf P et al. Does the timing of hypertonic saline resuscitation affect its potential to prevent lung damage? *Shock*. 2000;14(1):18-23.
23. Murao Y, Loomis W, Wolf P, Hoyt DB, Junger WG. Effect of dose of hypertonic saline on its potential to prevent lung tissue damage in a mouse model of hemorrhagic shock. *Shock*. 2003;20(1):29-34.
24. Oreopoulos GD, Hamilton J, Rizoli SB, Fan J, Lu Z, Li YH et al. In vivo and in vitro modulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression by hypertonicity. *Shock*. 2000;14(3):409-14; discussion 414-5.
25. Powers KA, Woo J, Khadaroo RG, Papia G, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock upregulates the anti-inflammatory response by alveolar macrophages. *Surgery*. 2003;134(2):312-8.
26. Prohaszka Z, Fust G. Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. *Mol Immunol*. 2004;41(1):29-44.
27. Rizoli SB, Kapus A, Fan J, Li YH, Marshall JC, Rotstein OD. Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *J Immunol*. 1998;161(11):6288-96.
28. Rocha e Silva M, Velasco IT, Nogueira da Silva RI, Oliveira MA, Negraes GA. Hyperosmotic sodium salts reverse severe hemorrhagic shock: other solutes do not. *Am J Physiol*. 1987;253(4 Pt 2):H751-62.
29. Rocha e Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics*. 2005;60(2):159-72.
30. Shoemaker WC, Peitzman AB, Bellamy R, Bellomo R, Bruttig SP, Capone A et al. Resuscitation from severe hemorrhage. *Crit Care Med*. 1996;24(2 Suppl):S12-23.
31. Silomon M, Pizanis A, Rose S. Oxyradical-mediated hepatocellular Ca²⁺ alterations during hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock*. 1999;11(3):193-8.
32. Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M Jr, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol*. 1980;239(5):H664-73.
33. Velasco IT, Rocha e Silva M, Oliveira MA, Silva RI. Hypertonic and hyperoncotic resuscitation from severe hemorrhagic shock in dogs: a comparative study. *Crit Care Med*. 1989;17(3):261-4.
34. Velasco IT, Rocha e Silva M. Hypertonic saline resuscitation is prevented by intracerebroventricular saralasin but not by captopril. *Braz J Med Biol Res*. 1989;22(2):237-9.
35. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105(20):2332-6.
36. Wang P, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem*. 1996;271(46):29223-30.
37. Weinstein PR, Hong S, Sharp FR. Molecular identification of the ischemic penumbra. *Stroke*. 2004;35(11 Suppl 1):2666-70.
38. Yada-Langui MM, Anjos-Valotta EA, Sannomiya P, Rocha e Silva M, Coimbra R. Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(7):684-93.
39. Younes RN, Birolini D. Hypertonic/hyperoncotic solution in hypovolemic patients: experience in the emergency room. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2002;57(3):124-8.
40. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(5):1404-7.