

EFEITOS IMUNOMODULADORES DA FRAÇÃO PURIFICADA HEV B 13 EM RATOS COM SEPSE

Immunomodulating effects of the purified Hev b 13 fraction on septic rats

Maxley Martins **ALVES**¹, Lilhian Alves de **ARAÚJO**^{1,2}, Fátima **MRUÉ**¹, Clayson Moura **GOMES**^{1,2}, Milton Adriano Pelli de **OLIVEIRA**², Roberpaulo Anacleto **NEVES**¹, Nelson Jorge da **SILVA-JÚNIOR**¹, Paulo Roberto de **MELO-REIS**¹

Trabalho realizado no ¹Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, Área V, Campus I, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia-GO, Brasil e ²Laboratório de Citocinas, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

DESCRIPTORIOS - Sepsis. Hev b 13. Imunomodulação.

Correspondência:
Lilhian Alves de Araújo
E-mail: lilhianalves@gmail.com

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 25/10/2016
Aceito para publicação: 09/02/2017

HEADINGS - Sepsis. Hev b 13. Immunomodulation.

RESUMO - Racional: Sepsis se correlaciona com a ruptura do complexo equilíbrio entre os mediadores inflamatórios, que principalmente na fase aguda da doença, produz exacerbadamente citocinas pró-inflamatórias levando a lesão de múltiplos órgãos e morte. A fração Hev b 13 tem demonstrado atividade biológica capaz de induzir a produção de IL-10 e regredir lesões de doenças inflamatórias. **Objetivo:** Investigar os efeitos imunomoduladores da fração Hev b 13 em ratos com sepsis. **Métodos:** Foi injetado *Acinetobacter baumannii* na cavidade peritoneal dos animais após lesão no pâncreas e estômago como porta de entrada. Após 10 h de infecção, foi realizada eutanásia para coleta de sangue e pulmões, em seguida, contagem total e diferencial de leucócitos, dosagem de citocinas e histopatologia para análise. **Resultados:** A administração de dose única da fração Hev b 13, 2 h após a indução de sepsis, diminuiu significativamente a contagem total de leucócitos. Associado a maior produção de IL-10 e IL-4, e menor de IL-6, atenuou as lesões nos tecidos pulmonares em comparação com os grupos controles. **Conclusão:** A fração Hev b 13 apresenta tendência anti-inflamatória, com potencialidades no tratamento da sepsis.

ABSTRACT - Background: Sepsis is a potentially life-threatening complication of an infection that occurs when chemicals released into the bloodstream to fight the infection trigger inflammatory responses throughout the body, especially in the acute phase of the disease, producing excessive pro-inflammatory cytokines, leading to multiple organ injury and death. The Hev b 13 fraction has demonstrated biological activity capable of inducing IL-10 production and shrinking inflammatory disease lesions. **Aim:** To investigate the immunomodulating effects of the Hev b 13 fraction on septic rats. **Methods:** *Acinetobacter baumannii* was injected into the peritoneal cavity of the animals after sustaining a lesion in the pancreas, with the stomach as an entry point. After 10 h of infection, they were euthanized for blood and lung collection, followed by total and differential leukocyte count, determination of cytokine level and histopathological analysis. **Results:** Administering a single dose of the Hev b 13 fraction 2 h after sepsis induction significantly decreased total leukocyte count. Higher IL-10 and IL-4 and lower IL-6 production shrank the lung tissue lesions compared to the control groups. **Conclusion:** The Hev b 13 fraction exhibits an anti-inflammatory tendency, with potential for sepsis treatment.

INTRODUÇÃO

A definição de sepsis abrange as situações nas quais se estabelece a síndrome da resposta inflamatória sistêmica desencadeada por infecção suspeita ou confirmada. Do ponto de vista clínico, a apresentação da sepsis se correlaciona às diversas possibilidades de interação entre homem e micro-organismos, podendo sobreviver de diferentes focos iniciais¹⁷.

As suas manifestações clínicas - tais como febre, edema, hipercoagulação, taquipneia e hipotensão periférica - derivam da liberação sistêmica de mediadores inflamatórios, denominados de citocinas, pelas células de defesa e endoteliais, desempenhando papel importante atuando como mensageiros químicos^{2,3}. Há ainda quem caracterize a sepsis como sendo a ruptura do complexo equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias¹⁰.

O desequilíbrio entre esses mediadores está fortemente relacionado com a severidade e mortalidade na sepsis, que principalmente na fase aguda da doença produz exacerbadamente citocinas pró-inflamatórias contribuindo para lesões em órgãos alvo, levando a insuficiência de múltiplos órgãos e morte. A associação entre concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF na fase aguda da sepsis e disfunções orgânicas graves tem sido estudada e comprovada^{5,10,13}.

Não existe no mercado nenhuma medicação efetiva em alcançar o contrabalanço da resposta inflamatória aguda até o momento¹⁴. Diversos protocolos de tratamento têm sido propostos no intuito de reduzir a morbimortalidade induzida pela resposta inflamatória na sepsis; no entanto, apesar de grandes avanços, a incidência de óbitos decorrente dela ainda é elevada, sendo necessária a busca de novos recursos terapêuticos^{1,17}.

Pesquisas recentes utilizando uma proteína derivada do látex natural da *Hevea brasiliensis* (seringueira), denominada Hev b 13, tem demonstrado atividade biológica capaz de induzir a produção de interleucina 10 (IL-10) in vitro, estimulando uma resposta anti-inflamatória¹⁹. Em outros experimentos utilizando modelos animais de retocolite ulcerativa, bem como de artrite reumatoide, o tratamento dos animais com a fração Hev b 13 demonstrou importante regressão das lesões em estudo²⁰.

Tendo em vista o potencial imunomodulador da fração purificada Hev b 13, o objetivo deste estudo foi investigar seus efeitos em ratos com sepse induzida experimentalmente.

MÉTODOS

Obtenção da Hev b13 e animais

A fração purificada Hev b 13, derivada do látex natural da *Hevea brasiliensis*, foi gentilmente fornecida pelo Laboratório Pele Nova Biotecnologia lote 1502-243.

Foram utilizados *Rattus norvegicus albinus* linhagem Wistar, machos adultos, apresentando peso corpóreo entre 200-300 g, procedentes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno, com piso sólido, forradas com maravalha esterilizadas, conforme padrões internacionais e Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. O ambiente foi mantido em temperatura média de 21° C, sistema de ventilação, ciclo de claro-escuro, dieta específica para espécie e água ad libitum. O experimento teve início após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da PUC-GO protocolo nº002/2013.

Cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente

As cepas utilizadas no experimento foram obtidas do Laboratório de Análises Clínicas do estado de Goiás, cultivadas, isoladas e diluídas para 6×10^8 UFC/mm³, com análise de viabilidade e perfil no Laboratório de Microbiologia do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, através da escala nefelométrica de Mc Farland. Posteriormente, foram submetidas à cultura e antibiograma para confirmação de resistência a antibióticos.

Indução da sepse

Os animais foram anestesiados no músculo anterior da coxa direita, com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Posteriormente, foi realizada antisepsia da região cirúrgica com clorexidina degermante e então, submetidos à laparotomia mediana com tração e secção transversa da parede gástrica de 0,5 cm, dissecação e secção do pâncreas espreado retrogástrico com ligadura das extremidades utilizando fio de seda 2,0 seguido de secção transversa do duodeno na segunda porção do mesmo. A síntese foi realizada com fio de poliéster 3,0 agulha cilíndrica, tanto gástrica quanto duodenal e avaliação cuidadosa da gastrorrafia e enterorrafia, checando a patência do trânsito e hemostasia completa. Neste momento, 1,0 ml da solução contendo *Acinetobacter baumannii* (6×10^8) foi injetada na cavidade peritoneal e após, realizada a sutura da parede abdominal em dois planos com fios de poliéster e nylon 3,0.

Grupos e tratamentos

O tratamento foi realizado de acordo com a randomização nos animais na segunda hora do pós-operatório na dose de 0,5 mg/Kg de Hev b 13 ou 1ml de solução fisiológica 0,9%. Os grupos ficaram assim distribuídos: Controle Normal - animais não expostos a qualquer tipo de procedimento ou tratamento; Controle Cirúrgico - animais submetidos apenas à operação sem inoculação de cepa e tratamento; Grupo Tratamento Hev b 13 - animais submetidos à cirurgia, com inoculação de cepa e tratamento com Hev b 13; Grupo Tratamento Solução Salina 0,9 % - animais submetidos à cirurgia, com inoculação de cepa e tratamento com solução fisiológica. A eutanásia foi realizada na décima hora de pós-operatório para coleta de material biológico. Este tempo foi determinado em estudo piloto no qual observou-se piora significativa nos sinais clínicos de sepse.

Leucograma e plaquetograma

Foram realizados no equipamento COBAS XE 2100D da ROCHE, pela metodologia de citometria e impedância elétrica. Para contagem diferencial, foram confeccionados esfregaços de novas amostras de sangue e corados com Panótico (Laborclin - Paraná - Brasil) para identificação dos leucócitos através das

suas especificidades morfológicas em microscópio óptico (Nikon, Modelo - Eclipse E – aumento de 400X).

Análise histopatológica

O pulmão direito foi fixado em solução de formaldeído a 10% e posteriormente, incluídos em parafina. Cada bloco foi preparado e seccionado em micrótomo a 5µm de espessura e, em seguida, corado com H&E, para visualização em microscópio de luz. As imagens foram obtidas por meio da câmera digital acoplada ao microscópio, com placa de captura Pinnacle Studio AV/DV Deluxe. A análise sobre as lesões histopatológicas dos pulmões foram classificadas em: (-) ausente; (+) leve; (++) moderado; (+++) acentuado, nas categorias infiltração de neutrófilos, edema intersticial, congestão, hemorragia, membrana hialina e necrose¹⁸.

Preparo das amostras e Elisa

Fragmentos de pulmão esquerdo foram coletados, pesados em balança de precisão, acondicionados em eppendorf's com 200 µl de tampão salino-fosfato 1X e estocados no freezer -80° C até a dosagem. Estes foram descongelados e acrescidos de 15 ml/mg de PBS 1X, 10% de solução de lise e 1% de inibidor de protease (Sigma), macerados manualmente, homogeneizados pelo aparelho Politron e posteriormente, centrifugados. Utilizou-se o sobrenadante do macerado das amostras para as dosagens de IL- 10, IL-4, IL-6 e TNF, através do ensaio imunoenzimático (Elisa), conforme instruções do fabricante nos kits BD-OptEIA™ Biosciences.

Análise estatística

As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir da curva padrão, obtida pela diluição seriada. Para comparação múltipla utilizou-se ANOVA (Análise de Variância) seguido pelo teste de Bonferroni, com nível de significância $p < 0.05$. Os resultados estão expressos em picogramas ou nanogramas de citocinas/miligramas de tecido e o cálculo realizado pelo programa GraphPad Prism versão 6.05. com nível de significância $p < 0.05$.

RESULTADOS

Perfil de resistência das cepas de *Acinetobacter baumannii*

A análise do perfil de resistência a antimicrobiano das cepas de *Acinetobacter baumannii* utilizadas na indução da sepse encontra-se disposta da Tabela 1, sendo elas resistentes a 14 diferentes tipos de antibióticos e sensíveis apenas a Tetraciclina e Trimetropim.

TABELA 1 – Antibiograma das cepas de *Acinetobacter baumannii*

Antimicrobiano	MIC*	Padrão
Amicacina	>32	Resistente
Amipicilina/Sulbactam	>16/8	Resistente
Cefepime	>16	Resistente
Cefotaxima	>32	Resistente
Ceftadizima	>16	Resistente
Ceftriaxona	>32	Resistente
Ciprofloxacino	>2	Resistente
Gentamicina	>8	Resistente
Imipenem	>8	Resistente
Levofloxacino	>4	Resistente
Meropenem	>8	Resistente
Piperacilina/Tazobactam	>64	Resistente
Tetraciclina	< 4	Sensível
Tobramicina	>8	Resistente
Trimetropim/Sulfadiazina	<2/38	Sensível

*Concentração Inibitória Mínima

Análise laboratorial de leucócitos e plaquetas

Na comparação entre as médias das análises laboratoriais de série branca e plaquetas, a contagem de leucócitos totais foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo tratado com Hev b 13 ($2748 \pm 633,3$) com relação ao grupo tratado com solução salina ($4416 \pm 1133,2$). O grupo controle normal ($2983 \pm 104,08$) também foi significativamente menor que o grupo solução

salina. Para as demais especificidades celulares, não houve diferença significativa.

Análise histológica dos pulmões

No grupo controle normal não houve alterações morfológicas e foram utilizadas para imagens de referência (Figura 1A). No controle cirúrgico houve leve edema de septos alveolares e raros pontos hemorrágicos (Figura 1B). Espessamento acentuado de septos alveolares com hemorragia intra-alveolar, infiltrados inflamatórios e hiperplasia celular foi observado no grupo tratado com solução salina (Figura 1C), ao passo que a inflamação intersticial no grupo tratado com a Hev b 13 foi menos severa, com espessamento moderado de septos, discreta hemorragia e menor quantidade de infiltrados inflamatórios (Figura 1D).

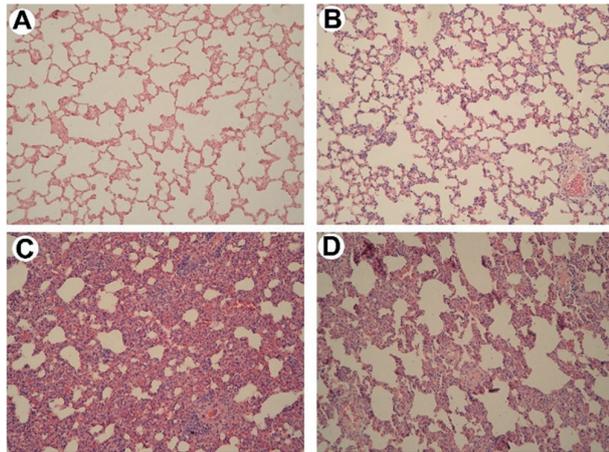


FIGURA 1- Efeitos do tratamento com a Hev b 13 na histologia pulmonar de ratos sépticos corados com H&E (magnification 40X): A) tecido pulmonar do grupo Controle Normal sem alterações morfológicas; B) grupo Controle Cirúrgico com leve espessamento de septos alveolares e raros pontos hemorrágicos; C) grupo Solução Salina com espessamento acentuado de septos alveolares, hemorragia e infiltrados inflamatórios; D) grupo Hev b 13 com espessamento moderado de septos alveolares, discreta hemorragia e infiltrados inflamatórios.

Análise de citocinas no tecido pulmonar

A produção de TNF no grupo tratado com a Hev b 13 foi semelhante ao grupo tratado com solução salina e grupo cirúrgico, com diferença significativa ($p < 0,05$) apenas com relação ao grupo

normal (Figura 2A).

Os níveis na produção de IL-10 no grupo tratado com Hev b 13 foi aumentado com relação a todos os demais grupos, no entanto significativo ($p < 0,05$) apenas entre os grupos normal e cirúrgico (Figura 2B).

Com relação aos níveis de IL-4, o grupo tratado com Hev b 13 apresentou maior produção que o grupo tratado com solução salina, no entanto não houve diferença significativa entre eles. Curiosamente, o controle cirúrgico apresentou médias significativamente maiores ($p < 0,05$) na produção de IL-4 com relação aos demais grupos (Figura 2C).

Na Figura 2D, a produção de IL-6 no grupo de animais tratados com Hev b 13 foi menor que no grupo tratado apenas com solução salina, mas não significativa. O controle cirúrgico apresentou níveis inferiores significativos ($p < 0,05$) entre o grupo tratado com solução salina e aumentados comparado ao grupo normal.

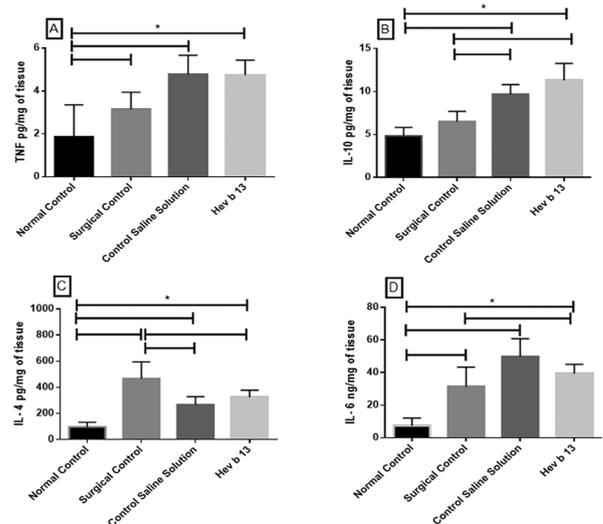


FIGURA 2- Efeitos da Hev b 13 na produção de citocinas em tecido pulmonar de ratos com sepse: Após 10 h de tratamento subcutâneo com 0,5 mg/Kg de Hev 13, os animais foram eutanasiados, coletado amostras do tecido pulmonar, inclusive dos grupos controle, para dosagem das citocinas com $n=8$ indivíduos por grupo. Os valores da concentração de IL-10 (2A), TNF (2B), IL-4 (2C) e IL-6 (2D) estão expressos em picogramas ou nanogramas de citocinas/miligramas de tecido. A linha horizontal representa a média \pm SD. * ($p < 0,05$) indica os grupos significativos entre si analisados pelo teste Anova seguido por Bonferroni.

TABELA 2 - Análise descritiva das análises laboratoriais de série branca e plaquetas, entre os grupos Controle Normal, Controle Cirúrgico, Tratamento SF 0,9% e Tratamento Hev b13

Parâmetros (103 μ l)	Controle normal	Controle cirúrgico	Controle SS	Hev b 13
Plaquetograma				
Média (\pm DP)	399666 (\pm 124073,9)	510600 (\pm 174513,3)	397000 (\pm 114024,1)	479480 (\pm 214806,8)
Varição	258000-489000	304000-751000	241000-522000	100400-634000
Leucócitos totais				
Média (\pm DP)	2983 (\pm 104,08)	3940 (\pm 432,8)	4416 (\pm 1133,2)*	2748 (\pm 633,3)
Varição	2900-3100	3560-4410	3340-5700	1930-3600
Neutrófilos				
Média (\pm DP)	1252 (\pm 46,7)	2125 (\pm 7,95)	1869 (\pm 956,429)	1096,28 (\pm 392,655)
Varição	1209-1302	1282-2808	939,3-2957,4	579-1530
Linfócitos				
Média (\pm DP)	1125 (\pm 75,18)	1794 (\pm 666,2)	1797,3 (\pm 103,109)	1171,4 (\pm 322,097)
Varição	1064-1209	1118-2450	1666,5-1938	663-1453,5
Eosinófilos				
Média (\pm DP)	19,3 (\pm 16,7)	11,6 (\pm 20,2)	22,6 (\pm 30,894)	37,56 (\pm 15,013)
Varição	0-29	0-35	0-57	25-62
Monócitos				
Média (\pm DP)	527 (\pm 41,4)	527 (\pm 151,7)	598,04 (\pm 168,9)	429,32 (\pm 287,951)
Varição	383-465	357-648	424,2-855	250,9-936
Basófilos				
Média (\pm DP)	49,6 (\pm 18,0)	26,3 (\pm 23,2)	22,56 (\pm 30,894)	13,42 (\pm 18,458)
Varição	0-62	0-44	0-57	0-36

DP= desvio-padrão; SS=solução salina; * = diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle normal e Hev b 13 comparados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni

DISCUSSÃO

A fração Hev b 13 é uma esterase alergênica, obtida a partir do látex natural da *Hevea brasiliensis*², que em frações altamente purificadas estimulou em estudos prévios monócitos humanos a produzirem níveis elevados de IL-10 e reduzir TNF, abrindo caminhos para a pesquisa de reações imunológicas mediadas por essa fração^{19,20}.

Sepse é uma forma grave de reação inflamatória sistêmica, geralmente causada por infecções bacterianas ocasionando aumento descontrolado da resposta inflamatória⁷. Neste sentido, a fração Hev b 13 foi administrada em ratos sépticos e seus efeitos imunomoduladores avaliados neste estudo.

Para induzir processo séptico nos ratos, lesiona-se estômago e pâncreas servindo como porta de entrada para a injeção de *Acinetobacter baumannii*. Este modelo foi utilizado para simular situações cotidianas nas UTI's brasileiras, onde essa bactéria com habilidades de desenvolver resistência, compromete a sobrevivência de pacientes que estão sobre intensa resposta inflamatória aguda, normalmente utilizando como *sítio de infecção* de feridas operatórias^{6,11}.

Neste estudo, os leucócitos totais do grupo tratado com a Hev b 13 apresentaram níveis diminuídos em relação ao grupo tratado com solução salina. Uma hipótese para esse primeiro resultado, seria a proteína ter causado a redistribuição dos leucócitos do compartimento vascular para o local da injúria de modo que o limitou no sangue. Por isso, os pulmões foram coletados para análise histopatológica e dosagem de mediadores inflamatórios, buscando possíveis danos teciduais. Foram encontradas alterações histopatológicas nos tecidos pulmonares dos animais sépticos. Essa ocorrência coincide com outros autores, visto que os pulmões são os órgãos mais frequentemente afetados na sepse grave^{10,21}. No entanto, a destruição dos alvéolos foi surpreendentemente atenuada nos animais que receberam o tratamento com a Hev b 13 (Figura 1D), com relação aos animais que receberam tratamento apenas com solução salina (Figura 1C). Esta proteção provavelmente ocorreu devido à inibição da inflamação ou estresse oxidativo, que são os dois mecanismos mais importantes responsáveis por lesões de órgãos na sepse¹², fato que se consolidou após os resultados da concentração de mediadores inflamatórios nos tecidos pulmonares.

Verificou-se que nos animais tratados com a Hev b 13, a concentração de IL-6 nos tecidos pulmonares, embora não significativa, foi menor em comparação ao grupo tratado apenas com solução salina. Estudos anteriores têm demonstrado que TNF e IL-6 são as citocinas mais fortemente associadas com a sepse. O excesso de produção destes mediadores inflamatórios induz lesão endotelial e epitelial, extravasamento vascular, edema e vasodilatação, favorecendo o desenvolvimento da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO)²³.

A diminuição na produção da IL-6 no próprio tecido pulmonar neste estudo pode ter atenuado o processo inflamatório, consequentemente o espessamento alveolar. Nossos estudos corroboram com Teixeira et al.¹⁹, onde a administração da Hev b 13 em camundongos com colite experimental promoveu redução da atividade inflamatória e infiltração de leucócitos na análise histológica do cólon distal. Em outro estudo, foi induzida em camundongos artrite experimental e tratada com a mesma fração. Os autores descreveram melhora notável nos achados histopatológicos das articulações de joelho, com diminuição na atividade inflamatória²⁰.

Observou-se também, que houve tendência maior na produção das duas citocinas anti-inflamatórias dosadas neste estudo, IL-4 e IL-10, nos animais tratados com a Hev b 13 comparativamente ao grupo controle tratado com solução salina. Alguns estudos correlacionam os efeitos protetores da IL-10 na sepse com fatores como: metodologia de indução do processo séptico (LPS- lipopolissacarídeo ou LPC- Ligadura e punção do

ceco) e tempo de intervenção⁸. Mas em geral, o tratamento de ratos sépticos com IL-10 atrasa o início da letalidade, aumenta a sobrevivência e estende-se a janela terapêutica¹⁵. Em contraste, a IL-10 administrada após o desenvolvimento do choque séptico grave, independente da metodologia de indução, pode ter seu benefício terapêutico limitado⁹.

Com relação a IL-4, sabe-se que ela desempenha papel importante na patogênese da sepse, mas sua função precisa durante o curso da doença ainda permanece desconhecida²². Estudos em animais revelaram que IL-4 aumentou a sobrevivência de camundongos expostos a doses letais de LPS⁴, e atividade anti-inflamatória em várias doenças autoimunes¹⁶. Neste estudo, o grupo controle cirúrgico apresentou níveis de IL-4 maiores que nos com sepse, mas não foram encontradas referências que pudessem explicar esse fato. Isso provavelmente contribuiu para atenuar as lesões nos alvéolos pulmonares, classificando-a como sendo uma proteína com potencialidades para o tratamento da sepse. Entretanto, como neste estudo foi utilizada dose única para o tratamento, sugere-se novas pesquisas abordando diferentes concentrações e dosagens para identificar com precisão todos os efeitos da Hev b 13 na sepse e seus mecanismos de ação.

CONCLUSÃO

A fração Hev b 13 apresenta tendência anti-inflamatória com potencialidades no tratamento da sepse.

REFERÊNCIAS

1. Araújo LA, Mrué F, Neves RA, Alves MM, Silva-Júnior, Silva MSS, et al. Effects of topical treatment with *Euphorbia tirucalli* latex on the survival and intestinal adhesions in rats with experimental peritonitis. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*. 2015; 28(4):243-46.
2. Arif SA, Hamilton RG, Yusof F, Chew NP, Loke YH, Nimkar S, et al. Isolation and characterization of the early nodule-specific protein homologue (Hev b 13), an allergenic lipolytic esterase from *Hevea brasiliensis* latex. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(23):23933-41.
3. Backer D, Donadello K, Taccone FS, Ospina-Tascón G, Salgado D, Vincent JL. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. *Annals of Intensive Care*. 2011;1(27).
4. Baumhofer JM, Beinbauer BG, Wang JE. Gene transfer with IL-4 and IL-13 improves survival in lethal endotoxemia in the mouse and ameliorates peritoneal macrophage immune competence. *European Journal of Immunology*. 1998; 28(2):610-15.
5. Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Critical Care*. 2007;11(2):R49.
6. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 2009;77(8):3150-60.
7. Hegde A, Uttamchandani M, Mochhala SM, Bhatia M. Plasma cytokine profiles in preprotachykinin-A knockout mice subjected to polymicrobial sepsis. *Molecular Medicine*. 2010;16(1-2):45-52.
8. Kalechman Y, Gafter U, Gal R, Rushkin G, Yan D, Albeck M. Anti-IL-10 Therapeutic Strategy Using the Immunomodulator AS101 in Protecting Mice from Sepsis-Induced Death: Dependence on Timing of Immunomodulating Intervention. *The Journal of Immunology*. 2002;169(1):384-92.
9. Lafiti SQ, O'Riordan MA, Levine AD. Interleukin-10 Controls the Onset of Irreversible Septic Shock. *Infection and Immunity*. 2002;70(8):4441-6.
10. Machado FR, Sanches LC, Azevedo LCP, Brunialti M, Lourenço D, Noguti MA, et al. Associação entre a evolução da disfunção orgânica e as concentrações de citocinas na fase inicial do choque séptico. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2011;23(4):426-33.
11. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber MJ, et al. Surveillance Cultures and Duration of Carriage of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45(5):1551-5.
12. Meng LM, Pai MH, Liu JJ, Yeh SL. Polysaccharides from extracts of *Antrodia camphorata* mycelia and fruiting bodies modulate inflammatory mediator expression in mice with polymicrobial sepsis. *Nutrition*. 2012;28(9):942-9.
13. Nguyen HB, Looma M, Yang JJ, Jacobsen G, Shah K, Otero RM. 2010. Early lactate clearance is associated with biomarkers of inflammation, coagulation, apoptosis, organ dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *Journal of Inflammation*. 2010;7(6).

14. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S. et al. Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(22):2055-64.
15. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide versus cecal ligation and puncture. *Shock*. 2000;13(2):110-6.
16. Röcken M, Racke M, Schevach EM. IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. *Immunology Today*. 1996;17(5):225-31.
17. Siqueira-Batista R, Gomes AP, Calixto-Lima L, Vitorino RR, Perez MCA, Mendonça EG, et al. Sepsis: atualidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2011;23(2):207-16.
18. Su X, Wang L, Song Y, Bay C. Inhibition of inflammatory responses by ambroxol, a mucolytic agent, in a murine model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Intensive Care Medicine*. 2004;30(1):133-40.
19. Teixeira LB, Coutinho-Netto J, Epifânio Vlaa, Lachat JJ, Foss NT. Oral treatment with Hev b 13 prevents experimental arthritis in mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 2012a;168(3):285-90.
20. Teixeira LB, Coutinho-Netto J, Epifânio Vlaa, Lachat JJ, Foss NT. Oral treatment with Hev b 13 ameliorates experimental colitis in mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 2012b;169(1):27-32.
21. Ware LB, Matthay MA, Zimmergan GA. The acute respiratory distress syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(8):2731-40.
22. Wibke S, Jürgen B, Richard B. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets- An Updated View. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013.
23. Zhou L, Gao M, Xiao Z, Zhang J, Li X, Wang A. Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis. *The Journal of Surgical Research*. 2015;195(2):559-67.