

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA NA
EVOLUÇÃO DA SEPSE POLIMICROBIANA EM
CAMUNDONGOS.**

Autora: Aline da Rosa Gonçalves
Orientadora: Prof.^a Dr^a Susana E. Moreno
Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano M. Espínola Carvalho

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Março-2018

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA NA
EVOLUÇÃO DA SEPSE POLIMICROBIANA EM
CAMUNDONGOS.**

Autora: Aline da Rosa Gonçalves
Orientadora: Prof.^a Dr^a Susana E. Moreno
Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano M. Espínola Carvalho

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde."

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Março-2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

G635a Gonçalves, Aline da Rosa
 Avaliação do efeito da N-acetilcisteína na evolução da sepse
 polimicrobiana em camundongos./ Aline da Rosa Gonçalves; orientadora
 Susana Elisa Moreno ; coorientador Cristiano Marcelo Espínola
 Carvalho -- 2018
 75 f.

 Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica
 Dom Bosco, Campo Grande, 2018.
 Inclui bibliografias.

 1.Sepse polimicrobiana 2. Camundongos - Pesquisa 3.Neutrófilos
 4. Biotecnologia I. Moreno, Susana Elisa II. Carvalho, Cristiano
 Marcelo Espínola III. Título.

CDD: 660.6



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

Avaliação do Efeito da N-Acetilcisteína na Evolução da Sepse Polimicrobiana em Camundongos

Autora: Aline da Rosa Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Susana Elisa Moreno

Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 14 de março de 2018.

Profa. Dra. Susana Elisa Moreno - UCDB

Prof. Dr. Octavio Luiz Franco - UCDB

Prof. Dr. Marcelo Augusto de Araújo - UFMS

“Um trabalho te dá um propósito e um significado. A vida é vazia sem ambos.”

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me proporcionar saúde e sabedoria nessa caminhada, agradeço imensamente aos meus pais, pelo apoio fundamental para que eu cumprisse esta etapa de minha formação acadêmica e por fim agradeço aos meus professores, primeiramente ao professor Dr. Cristiano Carvalho que me recebeu muito bem no programa, me incentivando à pesquisa e a minha querida professora e orientadora Dra. Susana Moreno, que me acolheu como sua orientada e me deu muita força, dividindo comigo sua experiência e conhecimento, também a doutoranda Danieli Fernanda Buccini, que me auxiliou nas atividades laboratoriais e a Ma. Gislaine Greice, minha colega, pelas ajudas nos experimentos e nas minhas dúvidas em geral e a todos os estagiários do laboratório.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Aline da Rosa Gonçalves, filha de Albertino Gonçalves da Fonseca e Ana Lucia Pereira da Rosa Fonseca, nasceu em Campo Grande, Mato Grosso do Sul em 09 de dezembro de 1987. Concluiu a graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Católica Dom Bosco no ano de 2007. Pós-graduada em Reprodução e Clínica Médica de Bovinos e Equinos pelo Instituto Qualittas de Pós-Graduação, no ano de 2012.

Atualmente é mestranda em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco, UCDB.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
2.1 Sepses.....	3
2.1.1 Fisiopatologia da sepsis.....	8
2.1.2 Resposta do organismo frente à infecção.....	12
2.1.3 Mediadores inflamatórios na sepsis.....	14
2.1.4 Imunopatologia da sepsis.....	17
2.2 Estresse oxidativo na sepsis.....	18
2.3 Antioxidantes na sepsis.....	21
2.4 N-acetilcisteína	22
2.5 Modelos experimentais para o estudo da sepsis.....	25
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais experimentais	29
4.2 Realização do modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP).....	29
4.3 Avaliação da sobrevivência de animais submetidos à sepsis tratados ou não com NAC.....	30
4.4 Tratamento com NAC.....	30
4.5 Obtenção de amostras experimentais.....	31
4.5.1 Coleta de sangue dos animais experimentais.....	31
4.5.2 Quantificação de bactérias e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) do sangue.....	31

4.5.3 Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais submetidos à sepse.....	31
4.5.4 Contagem total de células.....	32
4.5.5 Contagem diferencial.....	32
4.5.6 Quantificação de bactérias e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) do lavado peritoneal.....	32
4.5.7 Coleta de pulmão.....	33
4.5.8 Quantificação de bactérias e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) do pulmão.....	33
4.5.9 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) para quantificação do infiltrado leucocitário no pulmão.....	33
4.6 Análise estatística.....	33
5. Resultados.....	35
5.1 Avaliação da curva de sobrevivência de animais submetidos à sepse polimicrobiana tratados com NAC.....	35
5.2 Determinação do número de bactérias do lavado peritoneal e do sangue de animais submetidos à sepse polimicrobiana tratados com NAC.....	37
5.3 Avaliação do efeito da NAC sobre a migração de leucócitos totais e de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP.....	39
5.4 Quantificação de bactérias no pulmão de animais submetidos a CLP tratados com NAC.....	41
5.5 Ensaio da enzima mieloperoxidase (MPO) presente no pulmão de animais tratados ou não com NAC.....	42
6. Discussão.....	43
7. Conclusão.....	50
8. Referências.....	51

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Sepses – definições e diagnóstico.....	4
Quadro 2: Novas definições da Sepses 3.....	6
Quadro 3: Sinais e sintomas da sepses.....	11
Quadro 4: Principais agentes de defesa antioxidante.....	22

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Principais mecanismos de disfunção orgânica.....	9
Figura 2: Principais passos na patogênese da sepse, levando ao choque séptico e à síndrome da disfunção de múltiplos órgãos.....	14
Figura 3: Estrutura molecular da N-acetilcisteína.....	23
Figura 4: Esquema do procedimento do modelo CLP em roedores.....	27
Figura 5: Curva de sobrevivência de animais submetidos à sepse letal e sepse subletal tratados ou não com NAC.....	36
Figura 6: Quantificação bacteriana do lavado peritoneal e do sangue de animais submetidos à sepse letal e sepse subletal tratados com NAC.....	38
Figura 7: Contagem total de leucócitos e avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais submetidos à sepse letal e sepse subletal tratados com NAC.....	40
Figura 8: Quantificação bacteriana do pulmão de animais submetidos à sepse letal e sepse subletal tratados com NAC.....	41
Figura 9: Ensaio da enzima mieloperoxidase (MPO) do pulmão de animais submetidos à sepse letal e sepse subletal tratados com NAC.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

bpm – batimentos por minuto
CLP - Modelo de ligadura e perfuração do ceco
C5a - Mediador químico quimiotático
CASP- *Colon ascendens stent peritonites*
DAMPs – *Danger associated molecular patterns*
DO₂ – Oferta de oxigênio
DIC – Coagulação intracelular disseminada
EROs – Espécies reativas de oxigênio
i.p. – Intraperitoneal
irpm - incursões por minuto
i.v. – Intravenoso
IL-1 – Interleucina 1
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
IL-10 – Interleucina 10
IL-11 – Interleucina 11
IL-12 – Interleucina 12
IL-17 – Interleucina 17
IL-18 – Interleucina 18
IL-33 – Interleucina 33
IL-1 Ra – Antagonista do receptor da interleucina-1
IL1 β – Interleucina 1 beta
LAAO – L-amino ácido oxidase
LTB₄ – Leucotrieno B₄
LT: $\gamma\delta$ – Linfócitos T, gama delta
PAF – Fator de agregação plaquetária
PGE1 – Prostaglandina E1
PGE2 – Prostaglandina E2
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PMN - Polimorfonucleares
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SDMO – Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TLRS – *Toll-Like receptors*
TNF - Fator de necrose tumoral
TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

A sepse consiste em uma síndrome complexa de origem infecciosa ocasionada pela resposta inflamatória sistêmica de origem infecciosa, que pode determinar a disfunção ou falência de um ou mais órgãos, com progressão ao óbito. A sepse severa e o choque séptico estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes neutropênicos, imunossuprimidos ou pacientes hospitalizados. A resposta inflamatória sistêmica tem sido reconhecida como fator proeminente na mortalidade induzida pela sepse, sendo seu controle associado ao aumento da sobrevida dos pacientes. Até o momento apesar dos grandes investimentos na área, o tratamento tem eficácia reduzida. Desta forma, a investigação de estratégias terapêuticas complementares a antibioticoterapia é imperativa. Nesse contexto o presente trabalho teve por objetivo investigar o efeito da N-acetilcisteína sobre a evolução da sepse polimicrobiana. Para tanto, foi utilizado o modelo de CLP (ligação e perfuração do ceco) para a indução de sepse polimicrobiana em camundongos Swiss (CEUA: 014/2016). Foram avaliados quatro grupos experimentais sendo eles: sepse letal (100% de mortalidade), sepse subletal (60-80% de mortalidade) e os correspondentes grupos tratados com 300mg/kg de NAC. Os animais foram avaliados quanto à taxa de sobrevida, carga bacteriana no foco infeccioso e sistêmico, migração de neutrófilos para o foco infeccioso e pulmões. Nossos resultados demonstram que a NAC foi capaz de aumentar em 20% a sobrevida dos animais submetidos à sepse letal e em 40% dos animais submetidos à sepse subletal. Na avaliação da infecção local e sistêmica os animais tratados com NAC demonstraram redução da carga bacteriana no foco infeccioso, na corrente sanguínea e no pulmão. A NAC também foi capaz de estimular a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos submetidos à CLP. Entretanto não foram observadas diferenças entre os grupos tratados e não tratados no que concerne a infiltração de neutrófilos no pulmão. Nossos dados nos permitem concluir que a NAC possuiu ação benéfica na sepse de animais induzidos a CLP, tanto na sepse letal como na sepse subletal. Podemos concluir ainda que aumento da taxa de sobrevida dos animais submetidos à CLP parece estar associado ao controle da infecção favorecido pelo adequado recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso, além do controle dos efeitos sistêmicos deletérios decorrentes da disseminação das bactérias e de seus produtos para a circulação, como a presença de bactérias para órgãos distantes ao foco infeccioso.

Palavras chave: ligação e perfuração do ceco, inflamação, migração de neutrófilos.

ABSTRACT

Sepsis consists of a complex syndrome of infectious origin due to systemic inflammatory response of infectious origin, which can lead to dysfunction or failure of one or more organs, with progression to death. Severe sepsis and septic shock are among the leading causes of morbidity and mortality in neutropenic, immunosuppressed, or hospitalized patients. The systemic inflammatory response has been recognized as a prominent factor in sepsis-induced mortality, and its control is associated with an increase in patient survival. So far, despite large investments in the area, the treatment has effectively reduced. In this way, an investigation of therapeutic strategy complements the antibiotic therapy and imperative. In this context, the objective of this study was to investigate the effect of N-acetylcysteine on the evolution of polymicrobial sepsis. For this purpose, it was used in the CLP model (cecum ligation and perforation) for an induction of polymicrobial sepsis in Swiss mice (CEUA: 014/2016). (100% mortality), sublethal sepsis (60-80% mortality) and the corresponding groups treated with 300mg / kg of CAP. Asymmetric animals regarding survival rate, bacterial load in the infectious and systemic focus, migration of neutrophils to the infectious focus and lungs. Our results demonstrate that NAC is able to increase the survival of animals submitted to lethal sepsis and in 40% of animals submitted to sublethal sepsis by 20%. In the evaluation of the local and systemic infection of the NAC treated animals, they demonstrated a reduction of the bacterial load in the infectious center, in the bloodstream and in the lung. A NAC was also able to stimulate the migration of neutrophils into the peritoneal cavity of mice undergoing CLP. However, this is not a neutrophil infiltration in the lung. Our data allow us to conclude that NAC has a beneficial effect on the sepsis of animals induced by CLP, both in lethal sepsis and sublethal sepsis. We can also conclude that increasing the survival rate of the animals submitted to CLP seems to be associated with the control of the infection favored by the appropriate recruitment of neutrophils to the infectious focus, besides the control of the deleterious systemic effects resulting from the dissemination of the bacteria and their products to the circulation, as a presence of bacteria to organs distant from the infectious focus.

Key words: cecum ligation and perforation, inflammation, neutrophil migration.

1. INTRODUÇÃO

A sepse pode ser definida como uma condição clínica na qual a síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) está associada à infecção (VICENT, 2008; LEVY et al., 2003).

O termo sepse foi utilizado na Grécia antiga para designar casos onde havia putrefação e associação com doença e morte. Atualmente, sepse pode ser definida uma condição clínica resultante de infecção bacteriana, fúngica, viral ou parasitária, com o acesso desses microrganismos à corrente sanguínea (BONE, 1996). A presença desses agentes infecciosos nos tecidos ou sangue pode desencadear uma resposta inflamatória, que na, sepse não está circunscrita ao foco infeccioso, mas atinge o organismo como um todo. A progressão da sepse resulta em comprometimento da função de múltiplos órgãos, coagulação intravascular disseminada, síndrome da angústia respiratória aguda e morte (RIEDMANN et al., 2003).

O processo infeccioso na maioria das vezes é causado principalmente por bactérias gram-positivas (30-50%), bactérias gram-negativas (25-30%) e infecções polimicrobianas (25%), além de fungos, vírus e parasitas (2-5%) (MARTIN et al., 2003; VINCENT et al., 2011).

A sepse grave e o choque séptico constituem sérios problemas de saúde pública, afeta milhões de pessoas todos os anos e podem ser responsáveis pela morte de uma em cada quatro pessoas atingidas (SCHORR & DELLINGER, 2014), estando entre as principais causas de morbidade e mortalidade em indivíduos neutropênicos, pacientes hospitalizados e em indivíduos imunossuprimidos. Afetam cerca de 700 mil pessoas por ano (RIEDEMANN et al., 2003; PAES, 2004). A sepse grave também é a principal causa de morte nos Estados Unidos (EUA) e a principal causa de morte entre pacientes críticos, em unidades intensivas não coronarianas (SCHORR & DELLINGER, 2014).

O organismo possui um mecanismo natural de proteção antioxidante que são compostos por vitaminas, enzimas e sequestradores de oxigênio. Durante a sepse, ocorre um aumento de substâncias pró- oxidantes, além de uma redução dos estoques antioxidantes corporais. Estudos realizados em modelos animais demonstraram que os antioxidantes endógenos são insuficientes para neutralizar a quantidade de radicais

livres produzidos e tão pouco neutralizar o dano celular na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (ANGSTWURM et al, 1999; REMICK , 2003).

Na sepse, fatores como o quadro clínico instável do paciente, tempo de duração da hospitalização e internação prévia (TACCONELLI et al., 2007; CHEN, et al., 2008a), a falta do planejamento quanto ao uso de antimicrobianos (GANDHI et al., 2010; SALOMÃO et al., 2011) associada a presença de patógenos potencialmente multirresistentes, (VOGELAERS et al., 2010; PRADIPTA et al., 2013), torna necessária a associação dos antibióticos com outras medidas terapêuticas, tais como terapia nutricional, imunoterapia e uso de antioxidantes (PEREIRA JUNIOR et al., 1998; GROENEVELD et al., 2001; WILSON, 2013). Desta forma, a busca por novas alternativas, como o uso de antioxidantes associados ou não a antimicrobianos vem sendo cada vez mais visadas por pesquisadores.

Nesse sentido, sabendo do potencial antioxidante do composto N-acetilcisteína (NAC), e que a gravidade da sepse está associada ao incremento do estresse oxidativo causado por radicais livres, investigaremos o papel do NAC no aumento da sobrevivência de camundongos submetidos à sepse. A possibilidade de diminuir a mortalidade por sepse e reduzir os gastos com internação em UTIs, justificam a necessidade de maior investimento no estudo de terapias alternativas para o tratamento da patologia.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Sepses

A doença pode ser definida como uma síndrome de resposta inflamatória (SIRS), motivada por um agente agressor, associada à infecção sistêmica (BONE et al., 2009).

A sepsis é uma das doenças mais desafiadoras da medicina. Têm sido dispendidos esforços consideráveis para um melhor entendimento da inflamação sistêmica que caracteriza essa síndrome (ANGUS et al., 2001).

Qualquer pessoa com infecção pode desenvolver o quadro de sepsis, mas alguns fatores podem aumentar este risco. As populações mais vulneráveis são os idosos e os recém-nascidos, as pessoas com doenças crônicas, como diabetes ou câncer, aqueles que estão imunocomprometidos, como após o transplante de órgãos, esplenectomia, pessoas com vírus da imunodeficiência humana (HIV), pessoas que recebem terapia imunossupressora, como a quimioterapia, e pacientes desnutridos e debilitados (ROBSON, 2005).

Em 1991, foi realizada a Conferência de Consenso de Sepsis, que trouxe novas definições e critérios para o seu diagnóstico. A Conferência Internacional de Definição de Sepsis realizada em 2001 ampliou as listas de sinais e sintomas, facilitando as intervenções na assistência com precisão e rapidez no diagnóstico, norteando o trabalho da equipe multidisciplinar (CARVALHO & TROTTA, 2003). Após este consenso, foram definidos alguns termos de acordo com Matos & Victorino (2012):

- SIRS – resposta do organismo a um insulto variado (trauma, pancreatite, grande queimado, infecção sistêmica), com a presença de pelo menos dois critérios descritos no quadro 1.

- Sepsis – quando a SIRS é decorrente de um processo infeccioso comprovado.
- Choque séptico – quando a hipotensão ou hipoperfusão induzido pela sepsis é refratária à ressuscitação volêmica adequada e com subsequente necessidade de administração de agentes vasopressores.

- Falência de múltiplos órgãos – alteração na função orgânica de forma que a homeostasia não possa ser mantida sem intervenção terapêutica. Geralmente são

utilizados parâmetros de seis sistemas-chave: pulmonar, cardiovascular, renal, hepático, neurológico e coagulação.

Diversos sinais e sintomas podem estar presentes, devendo ser lembrados em função da dificuldade diagnóstica, sobretudo em pacientes graves cujas doenças são complexas e com frequência já estão em uso de antimicrobianos (MATOS & VICTORINO, 2012).

Quadro 1: Sepses – definições e diagnóstico.

Infecção	Processo patológico causado pela invasão de tecidos previamente estéreis por microrganismos patogênicos.
SIRS	Temperatura > 38°C ou < 36°C; Frequência cardíaca > 90 bpm; Frequência respiratória > 20 irpm; Leucometria (leucócitos > 12.000 ou < 4.000).
Sepses	Síndrome clínica definida pela presença de infecção e SIRS.
Sepses Grave	Sepses complicada com uma ou mais disfunções orgânicas.
Choque séptico	Sepses associada à hipotensão refratária a volume adequada.

Fonte: BOECHAT, 2010.

Como foi descrito, até 2012 a sepsis havia sofrido duas atualizações, porém recentemente em 2016, a Society of Critical Care Medicine (SCCM) e a European Society of Critical Care Medicine (ESICM) promoveram uma nova Conferência de Consenso e publicaram as novas definições de sepsis, conhecidas como Sepsis 3 ou Sepses 3, (SINGER et al., 2016).

O JAMA (The Journal of the American Medical Association), e a Sepsis Definitions Task Force, publicaram artigos atualizando as definições de sepsis e choque séptico e dando evidências científicas para a derivação e validação dessas novas definições. Em resumo, a definição ampla de sepsis pela nova publicação, é definida pela “presença de

disfunção orgânica ameaçadora à vida secundária à resposta desregulada do organismo à infecção”. O diagnóstico clínico de disfunção orgânica se baseia na variação de dois ou mais pontos no escore Sequential Organ Failure Assessment (SOFA), (SINGER et al., 2016), (Quadro 2).

O SOFA ou “quick SOFA” (qSOFA), essa ferramenta é válida para ser utilizada a beira do leito para identificar rapidamente pacientes adultos com maior probabilidade de ter desfechos clínicos desfavoráveis, se eles apresentarem infecção, funciona como uma ferramenta de triagem que procura identificar pacientes graves, e que não deve ser utilizada para definição de sepse.

Essa nova atualização da sepse foi necessária para se obter um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelas disfunções celulares e moleculares relacionadas à sepse e que contribuem para morbidade e mortalidade associadas com essa síndrome (ABRAHAM, 2016).

Devido a essa atualização, segundo Seymour et al (2016) a sepse pode ser definida como disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção e segundo Shankar-Hari, (2016) o choque séptico consiste em sepse acompanhada por profundas anormalidades circulatórias e celulares capazes aumentar a mortalidade substancialmente. A presença dos critérios da SRIS não é mais necessária para a definição da sepse. Uma das mensagens principais é a de que todos os casos de sepse devem ser considerados como doença grave, de forma que a expressão “sepse grave” deve ser abolida (SINGER et al., 2016; SEYMOUR et al., 2016; SHANKAR-HARI, 2016).

Quadro 2: Novas definições da Sepse 3.

	DEFINIÇÕES ANTIGAS	DEFINIÇÕES NOVAS
SEPSE	<p>SIRS: temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; frequência cardíaca $> 90\text{bpm}$; frequência respiratória $> 20\text{ mrm}$ ou $\text{PaCO}_2 < 32\text{ mmHg}$; e leucocitos totais $< 4,000$ ou $> 12,000$, ou $> 10\%$ de bastões</p> <p>+</p> <p>Suspeita de Infecção</p>	<p>Suspeita/comprovação de Infecção</p> <p>+</p> <p>2 ou 3 no qSOFA ou aumento de 2 ou mais no SOFA</p>
SEPSE GRAVE	<p>Sepses</p> <p>+</p> <p>PAS < 90 ou PAM < 65</p> <p>Lactato $> 2.0\text{ mmol/L}$</p> <p>RNI > 1.5 ou KTTTP $> 60\text{ s}$</p> <p>Bilirrubina $> 2.0\text{ mg/dL}$</p> <p>Débito Urinário $< 0.5\text{ ml/Kg/h}$ por 2h</p> <p>Creatinina $> 2.0\text{ mg/dL}$</p> <p>Plaquetas $< 100,000$</p> <p>SaO₂ $< 90\%$ em AA</p>	<p>Definição Excluída</p>
CHOQUE SÉPTICO	<p>Sepses</p> <p>+</p> <p>Hipotensão mesmo com reanimação volêmica adequada</p>	<p>Sepses</p> <p>+</p> <p>Necessidade de vasopressores para manter PAM > 65</p> <p>Lactato $> 2\text{ mmol/L}$ após reanimação volêmica adequada</p>

PaCO₂: pressão parcial de CO₂ (gás carbônico) no sangue arterial ; PAS: pressão arterial sistólica; PAM :pressão arterial média; RNI: relação normatizada internacional; KTTTP: tempo de tromboplastina parcial ativado; SaO₂: saturação de oxigênio do sangue.

Fonte: <http://www.ilas.org.br/>

A sepse tem sido vista como um problema de saúde mundial, afetando milhões de pessoas com índices elevados de morbidade e de mortalidade. Acredita-se que 30 milhões de casos ocorram anualmente, com mortalidade de um a cada quatro pessoas, e aumentando na incidência de um para cinco. Supera o índice de mortalidade de doenças clássicas, como acidente vascular isquêmico, infarto agudo do miocárdio e responsável por mais óbitos do que câncer de intestino e de mama combinados. É responsável por 25% da ocupação de leitos em UTI no país e é a principal causa de morte na UTI (DELLINGER et al., 2013). Segundo dados do Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), em estudo realizado entre 2005 e 2013, foram verificados 14.643 pacientes no Brasil com sepse; destes, 55,2% com sepse grave e 44,8% com choque séptico, cuja mortalidade foi de 34,8% e 64,5% respectivamente.

Os dados demonstraram que no Brasil a sepse severa atinge aproximadamente 27% dos pacientes de UTI, com uma taxa de mortalidade em torno de 40%. Este índice sobe para perto de 53% quando diagnosticado o choque séptico. Além disso, o grupo de pacientes que apresenta a SIRS, associada à infecção tem uma maior probabilidade de morte (SILVA et al., 2014). Apesar dos grandes avanços na medicina intensiva, a incidência de sepse vem aumentando nos últimos anos, sendo considerada a principal causa de morte em unidades de tratamento intensivo não coronarianas. Anualmente, em todo o mundo, ocorrem cerca de 18 milhões de casos de sepse grave. (ANDRADE et al., 2006).

A sepse pode é considerada dispendiosa para os sistemas de saúde em todo o mundo, tanto do ponto de vista econômico como social (CARVALHO & TROTTA, 2003). Estima-se que há um custo anual de 17 bilhões de reais ao sistema hospitalar decorrentes do tratamento da sepse e suas complicações. Destes, 10 bilhões de reais são gastos com pacientes que progridem para o óbito. Apesar desses altos investimentos, trabalhos demonstram que parte desses pacientes morre por falta de precocidade no diagnóstico da doença e ausência de sistematização e tratamento eficiente (COLLUCI, 2006).

Nos Estados Unidos, os gastos públicos chegam a atingir U\$16,7 bilhões (SCHORR & DELLINGER, 2014). No Brasil, a sepse é a doença geradora de maiores custos aos setores públicos e privados. Em 2003 os gastos com pacientes de UTI somaram 17,34 bilhões de reais, o que representa cerca de 30 a 40% dos gastos totais com saúde no país (ANDRADE et al., 2006).

Apesar do grande número de estudos acerca da sepse, ainda não há total compreensão da doença. Contudo, não se pode negar avanços em relação ao diagnóstico mais precoce, rastreamento microbiano mais eficaz que possibilita o rápido início do tratamento, o uso otimizado das variáveis hemodinâmicas e das técnicas de terapia suporte (KOLLEF, 2006).

Tendo como estímulo a importância deste tema, muitos esforços têm sido empregados para o desenvolvimento de terapias potenciais, para a melhor compreensão da inflamação sistêmica, da falência de múltiplos órgãos, para o desenvolvimento de biomarcadores de resposta terapêutica e prognóstica.

2.1.1 Fisiopatologia da Sepse

Na sepse, as alterações homeostáticas e disfunções mais proeminentes podem ser consequências de uma resposta inflamatória exacerbada, devido à interação de um complexo sistema de comunicação entre o agente infeccioso e células de defesa. Notadamente, parte dos efeitos nocivos encontrados na sepse grave como a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos, certamente pode ser originada da ação inespecífica dessas células e de seus mediadores em órgãos distantes do foco infeccioso, comprometendo seu funcionamento (BELLINGAN, 2000).

Durante a sepse deve-se avaliar pelo menos três processos distintos, porém interligados e que acontecem quase concomitantemente, contribuindo para a evolução da sepse. São eles: o foco infeccioso, como agente inicial ou causal; a participação de células de defesa envolvidas na resposta imune ou adaptativa do organismo e por fim, as alterações hemodinâmicas (MORENO, 2005). Durante um quadro infeccioso, o organismo responde inicialmente de forma não específica, liberando mediadores inflamatórios na tentativa de eliminar o agente agressor. O sistema imune inato consiste na primeira linha de defesa do hospedeiro e está envolvido na detecção de diversos microrganismos invasores. Os receptores da resposta imune inata podem ser ativados por componentes de parede celular das bactérias, como o lipopolissacarídeo (LPS), que é uma molécula que está intimamente envolvida na fisiopatologia da sepse (DAUPHINEE & KARSAN, 2006). Caso a resposta inata local não elimine o agente infeccioso, pode ocorrer a proliferação e disseminação do agente patogênico com

liberação exacerbada de mediadores inflamatórios locais e sistêmicos, atingindo órgãos distais podendo culminar na falência de múltiplos órgãos e morte (COHEN, 2002).



Figura 1: Principal mecanismo da disfunção orgânica. (BONE et al., 1992).

Na sepse ocorrem fenômenos inflamatórios, que incluem ativação de citocinas, produção de óxido nítrico, radicais livres de oxigênio e expressão de moléculas de adesão no endotélio. Pode haver também alterações importantes dos processos de coagulação e fibrinólise. Deve-se entender que todas essas ações têm o intuito fisiológico de combater a agressão infecciosa e restringir o agente ao local onde ele se encontra. Ao mesmo tempo, o organismo contra regula essa resposta com desencadeamento de resposta anti-inflamatória. O equilíbrio entre essas duas respostas é fundamental para que o paciente se recupere (SOGAYAR et al., 2008). O desequilíbrio entre essas duas forças, inflamatória e anti-inflamatória, pode ser o responsável pela geração de fenômenos que culminam em disfunções orgânicas (COHEN, 2002).

Basicamente, podem ocorrer alterações celulares e circulatórias, tanto na circulação sistêmica como na microcirculação. Entre as alterações circulatórias, os pontos mais marcantes são a vasodilatação e o aumento de permeabilidade capilar,

ambos contribuindo para a hipovolêmica relativa e hipotensão. Do ponto de vista da microcirculação, pode ocorrer heterogeneidade de fluxo com redução de densidade capilar, trombose na microcirculação e alterações reológicas das células sanguíneas. Todos esses fenômenos contribuem para a redução da oferta tecidual de oxigênio e, por consequência, para o desequilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio, com aumento de metabolismo anaeróbio e hiperlactatemia. Além disso, fazem parte dos mecanismos geradores de disfunção os fenômenos celulares de apoptose e hipoxemia citopática, quando há dificuldade na utilização de oxigênio pelas mitocôndrias.

O quadro de sinais e sintomas de sepse sugerida pela *Sepsis Definition Conference* em 2003 (LEVRY et al., 2003) pode ser guia útil ao diagnóstico, de tal forma que quando presentes sem outra explicação possível o diagnóstico de sepse deve ser considerado (Quadro 3). Deve ser ressaltada a necessidade de diagnóstico precoce de maneira que as intervenções de alto impacto na morbimortalidade da sepse possam ser instituídas no tempo adequado. Sabe-se que as seis primeiras horas após o diagnóstico constituem-se a janela de oportunidade do tratamento da sepse (RIVERS et al., 2005) e a terapia de otimização precoce de variáveis fisiológicas, quando aplicada nesta fase, é capaz de reduzir a mortalidade da sepse grave e choque séptico em cerca de 16% (RIVERS et al., 2001; RIVERS et al., 2008).

Os achados clínicos da sepse são inespecíficos e podem estar relacionados, na maioria dos casos, ao sítio primário da infecção (SANTOS, 2003). Pacientes sépticos pode apresentar sinais como: febre acompanhada de calafrios, frequentemente de início abrupto; hiperventilação com alcalose respiratória e mudanças no estado mental; dor; cefaleia; náusea; diarreia; letargia; prostração (ou por hipotensão com vasodilatação periférica e rubor ou vasoconstrição periférica e palidez); anorexia; mialgia; taquicardia; taquipnéia; oligúria e irritabilidade (CHAMBERS, 1995; SANTOS, 2003).

Quadro 3: Sinais e sintomas da sepse.

Sinais e sintomas gerais	Febre ou hipotermia, taquipneia–alcalose respiratória, taquipneia–acidose respiratória, balanço de fluidos positivo - edema.
Reação inflamatória / hematológica	Leucocitose ou leucopenia marcadores inflamatórios (PCR, Pró-calcitonina, IL-6).
Alterações hemodinâmicas	Hipotensão; Taquicardia inexplicada; Aumento do débito cardíaco; Baixa resistência vascular sistêmica; Saturação venosa central baixa ou muito alta livedo reticular / palidez; Redução do débito urinário Hiperlactacidemia /Aumento do déficit de base.
Sinais de disfunções orgânicas	Hipoxemia (lesão pulmonar aguda); Estado mental alterado; Alterações inexplicadas da função renal; Hiperglicemia Trombocitopenia/ CIVD; Alterações inexplicadas da função hepática Intolerância à alimentação (trânsito intestinal reduzido).

PCR = Proteína C-reativa; CIVD = coagulação intravascular disseminada.

Fonte: LEVRY et al., 2003.

As manifestações clínicas como febre, leucocitose, taquicardia e taquipnéia muitas vezes podem não ser observados nos pacientes. A hipertermia pode se manifestar em outros tipos de choque, mas pode ficar ausente no choque séptico (cerca de 15 a 20% dos pacientes apresentam-se com hipotermia, que está associado a um pior prognóstico). A leucocitose é outro tipo de marcador inespecífico frequentemente presente em outros tipos de choque, assim como a taquipnéia. Porém, o padrão hemodinâmico e hiperdinâmico manifestado por um débito cardíaco elevado e uma resistência vascular sistêmica reduzida, por mais que ocorra em situações não infecciosas, é de suma importância para a redobrada atenção no diagnóstico de sepse e choque séptico (LEVRY et al., 2003).

Portanto, o profissional de saúde deve ficar atento às manifestações clínicas observadas por consequência de uma resposta inflamatória sistêmica, dentre estas podemos citar: as alterações do sistema nervoso central, cardiovascular, hemodinâmicas, disfunções metabólicas, cascata de coagulação, colapso circulatório, disfunção orgânica, lesão pulmonar aguda, insuficiência renal, disfunção hepática, disfunção imune e manifestações cutâneas (SILVA & VELASCO, 2007).

2.1.2 Resposta do organismo frente à infecção

A inflamação consiste em uma resposta normal do hospedeiro contra qualquer agente infeccioso. Sepse e SIRS podem ser caracterizadas pela produção excessiva de mediadores inflamatórios e pela excessiva ativação de células inflamatórias, resultando numa anarquia metabólica, na qual “o próprio organismo não consegue controlar o que ele próprio criou” (BONE, 1992). A hiperativação da resposta inflamatória pode ser a característica mais notável no quadro de sepse, que pode ser iniciada por bactérias e/ou seu produto principal o LPS (RUSSEL, 2006). Por tanto, tanto bactérias inteiras ou LPS, estão intimamente ligados à exacerbação da resposta inflamatória (BOOMER et al., 2011).

A principal consequência desta resposta inflamatória concerne no comprometimento de muitos órgãos e o quadro de choque com evolução para a síndrome da insuficiência de múltiplos órgãos, o que resulta em alta mortalidade. Com o intuito de se ter efeito esperado e benéfico, a terapia farmacológica tanto na sepse como na SIRS deve mimetizar e compensar a defesa natural do organismo, com o

objetivo de bloquear a resposta inflamatória mais precocemente possível (BONE, 1991; PARRILO, 1993; RÉA NETO, 1996).

A infecção pode ser apontada como a causa primária do quadro de sepse, ela pode ser iniciada em qualquer parte do corpo, especialmente no trato urinário, abdômen, fluxo sanguíneo ou pulmões (WIDMEIER & WESLEY 2014; MERRELL, 1995; HUGONNET et al., 2004; BEWICK et al., 2008). A Invasão microbiana ativa o sistema imunológico do hospedeiro, o que conseqüentemente desencadeia a resposta imune inata mediada por células de defesa. . Estas células imunológicas inibem as invasões e multiplicação de micróbios por fagocitose, posteriormente os matando (TODAR, 2008). Quando a infecção ou bacteremia ocorre, a primeira linha de defesa do hospedeiro é realizada por células fagocitárias (macrófagos, monócitos e granulócitos polimorfonucleares) e também pela via alternativa do complemento, que neste momento age de maneira não específica. Após isso, as imunoglobulinas e as células imunocompetentes desencadeiam uma resposta imune específica (BONE, 1991; RÉA NETO, 1996). Desta forma, os componentes da parede bacteriana podem ser os principais ativadores desta resposta no hospedeiro: as endotoxinas dos microrganismos Gram-negativos (principalmente o lipídio A) e o ácido teicóico dos microrganismos Gram-positivos. Estes componentes por sua vez podem desencadear uma cascata inflamatória, sendo, inicialmente, liberados o TNF- α e a IL-1, que estimulam uma intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos (THIJS et al., 1995), (Figura 2).

Uma das alterações que pode ser mais importantes na SIRS, sepse e no choque séptico é a adesão de leucócitos nas células endoteliais. Esta interação é regulada por cargas elétricas e pela presença de receptores específicos da membrana das células envolvidas. A adesão leucocitária é estimulada pela ação das citocinas inflamatórias, especialmente IL-1 e TNF- α (POBER et al., 1986).

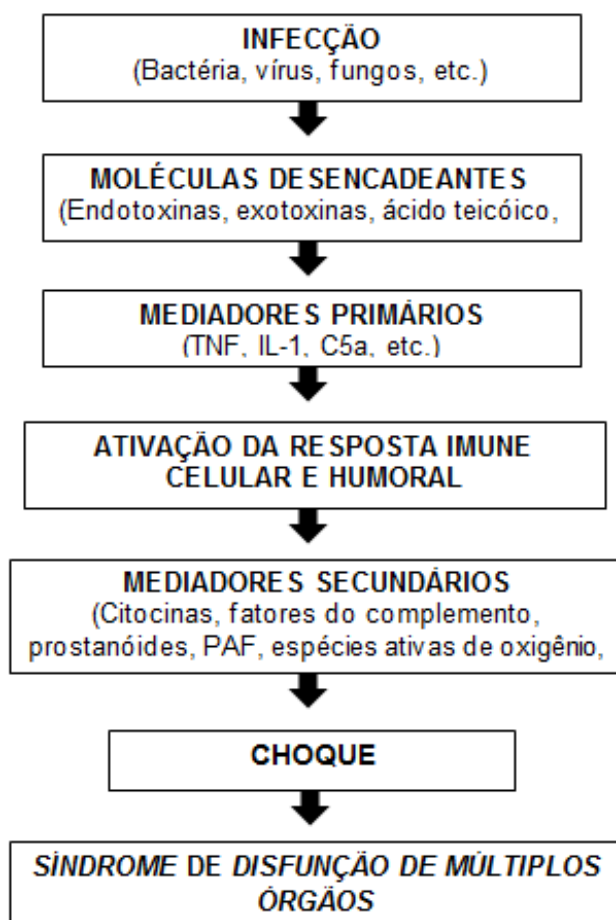


Figura 2: Principais passos na patogênese da sepse, levando ao choque séptico e à síndrome da disfunção de múltiplos órgãos. (PEREIRA JUNIOR et al., 1998).

2.1.3 Mediadores Inflamatórios na sepse

À medida que reconhecem produtos bacterianos, como as endotoxinas, as células do sistema imune inato como macrófagos e neutrófilos podem liberar vários mediadores inflamatórios, dentre eles as citocinas. Elas podem atuar como efetoras ou moduladoras da resposta inflamatória, as quais por sua vez podem ser encontradas exercendo um papel crucial no desenvolvimento da sepse. Apesar das citocinas serem importantes para as funções homeostáticas, a sua produção e liberação excessiva pode levar ao dano tecidual e conseqüentemente, a disfunção orgânica (DAUPHINEE & KARSAN, 2006).

O desenvolvimento da sepse pode ser dependente das relações estabelecidas entre o microrganismo e o hospedeiro. As proteínas e endotoxinas das bactérias

podem ser transferidas aos receptores existentes na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Após esta fase de reconhecimento, sucedem-se vários eventos de ativação celular e produção de citocinas, cujo resultado é a SIRS. Ocorre, neste contexto, a produção e secreção de inúmeras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e TNF- β , eventos considerados cruciais no desenvolvimento de sepse (AZIZ et al., 2013).

Os macrófagos, monócitos ativados podem produzir, sequencialmente, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 (FONG et al., 1990; LOWRY, 1993). Estas citocinas podem agir em outras células ou elementos sanguíneos (polimorfonucleares, células endoteliais, fibroblastos, plaquetas e nos próprios monócitos) através da ligação a seus receptores de superfície, induzindo a produção e liberação de mediadores, contribuindo para uma resposta inflamatória tardia (BONE, 1991; PARRILO, 1993; THijs et al., 1995). Após a liberação de TNF- α , IL-1 e PAF, o ácido araquidônico (ácido graxo abundante na maioria das membranas celulares) é metabolizado, formando os leucotrienos, tromboxano A₂ e prostaglandinas (especialmente a PGE₂ e PGI₂). A IL-1 e IL-6 ativam as células T a produzir IFN- γ , IL-2 e IL-4, quase todos estes agentes agem diretamente no endotélio vascular (BONE, 1991; MOLDAWER, 1994). Neste termo, deve ser feita uma distinção entre os efeitos locais das citocinas e as consequências de seus altos níveis na circulação sistêmica, seus efeitos locais envolvem o recrutamento de células fagocitárias que se mostra essencial para a eliminação dos microrganismos, enquanto que os efeitos sistêmicos geram danos ao hospedeiro. (FONG et al., 1990; BONE, 1991; LOWY, 1993).

Como foram mencionadas, as citocinas podem ser reguladoras da resposta imune frente à infecção e desempenham um papel fundamental na regulação da inflamação e do trauma. Atualmente existem dois tipos de citocinas, as citocinas pró-inflamatórias que atuam na estimulação da inflamação sistêmica, e as citocinas anti-inflamatórias que podem inibir a inflamação e melhoram a cicatrização. (CHAUDHRY et al., 2013).

As principais citocinas pró-inflamatórias que se encontram na regulação das respostas inflamatórias incluem a IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e o TNF- α . Outros mediadores pró-inflamatórios incluem membros da família IL-20, fator inibidor da leucemia (LIF), IFN- γ , oncostatina M (OSM), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator de crescimento transformante, fator de estimulação de colônias de macrófagos, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, IL-33 e uma variedade de outras quimiocinas que atraem células inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias atuam como pirógenos endógenos (IL-1,

IL-6, TNF- α), regulam a síntese de mediadores secundários e outras citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e células mesenquimais, tais como fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais, e estimulam a produção de proteínas de fase aguda, ou atraem células inflamatórias (AZIZ et al., 2013).

Já as citocinas anti-inflamatórias apresentam-se como um grupo de moléculas imunorreguladoras que podem estar envolvidas na prevenção de efeitos potencialmente nocivos de reações inflamatórias persistentes ou em excesso. As principais citocinas anti-inflamatórias incluem o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13 (OPAL & DEPALO, 2000).

A regulação deste equilíbrio pró e anti-inflamatório pode ser complexa. Destaca-se a atuação dos monócitos e macrófagos como ativadores da resposta imune adaptativa, pois ao fagocitarem as células necróticas ou bactérias, os macrófagos induzem os linfócitos na liberação de substâncias pró-inflamatórias, como INF- α , INF- δ e IL-2. Assim ao fagocitarem células apoptóticas na produção de IL-4 e IL-10, as mesmas desaceleram a resposta pró-inflamatória (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Após a recuperação da sepse, estudos clínicos têm demonstrado que os pacientes podem desenvolver um quadro de imunossupressão, o qual tem como principal manifestação clínica o aumento da suscetibilidade às infecções oportunistas (BENJAMIM et al., 2004; BARICHELLO et al., 2007; WANG & DENG, 2008). Do mesmo modo a imunossupressão tardia do hospedeiro pode ser responsável pela morte em pacientes com sepse (BOOMER et al., 2011; CHAUDHRY et al., 2013). Em um estudo recente Alves-Filho et al (2017), demonstraram que a IL-33 pode contribuir com a imunossupressão por longo prazo, uma vez que ela pode favorecer com o aumento da expansão da população de células T regulatórias.

Mediante a isso se tornou claro que a sepse pode ser tipicamente caracterizada por uma intensa resposta inflamatória inicial ou uma tempestade de liberação de citocinas, estas citocinas desencadeiam uma resposta inflamatória benéfica, tal como aumento da coagulação local e danos teciduais restritos, porém a produção exacerbada destas citocinas pró-inflamatórias pode ser muito perigosa na medida em que as citocinas excessivas destroem a regulação normal da resposta imune e induzem distúrbios inflamatórios patológicos, como fuga capilar, lesão tecidual e falência letal de órgãos (BOOMER et al., 2011).

2.1.4 Imunopatologia da sepse

O desenvolvimento de sepse após lesão orgânica ou infecção pode ser determinado não só pelo agente agressor, virulência do patógeno, mas, sobretudo, por caracteres genéticos de cada indivíduo (NAMATH & PATTERSON, 2009).

O somatório destes fatores combinados pode desencadear uma série de eventos imunológicos, metabólicos e hemodinâmicos que culmina com o estado que tem sido denominado de sepse. A quebra de barreiras anatômicas, lesão orgânica ou a simples redução da competência imunológica de um indivíduo possibilitam a invasão microbiana de tecidos. Cada microrganismo pode possuir um caráter molecular próprio, como os lipopolissacarídeos de membrana das bactérias gram-negativas, açúcares da parede celular de fungos, etc., esse caráter é denominado de Padrão Molecular Associado ao Patógeno (PAMPS) (CINEL & OPAL, 2009). Uma vez que invadem e multiplicam-se nos tecidos, esses patógenos podem ser identificados por elementos do sistema imune inato através destes padrões moleculares, as células do sistema imune inato como macrófagos, neutrófilos, linfócitos T: $\gamma\delta$, reconhecem elementos moleculares através de receptores que reconhecem padrões moleculares chamados de *Toll-Like receptors* ou TLRs (SALOMÃO et al., 2008). Com os macrófagos e células dendríticas uma vez ativadas, eles produzem grandes quantidades de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2) que são capazes de promover inflamação tecidual. Na sepse grandes quantidades de TNF- α levam a sintomas sistêmicos, aumento do metabolismo, hipotensão arterial e trombofilia. Além disso, a explosão respiratória (*respiratory burst*), no interior de macrófagos e neutrófilos ativados, é responsável pela liberação de óxido nítrico, cujo efeito vasodilatador e hipotensor irá contribuir para o choque séptico (NGUYEN et al., 2004; ARNOLD et al., 2008).

A lesão celular e tecidual pode acometer a liberação de moléculas endógenas, conhecidas como *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMPs) que são capazes de ativar a resposta imune, de forma independente dos patógenos e exercem papel de relevância na sepse. Entre estas podem se destacadas *heat shock proteins* (proteínas de choque térmico), a proteína HGMB1, heparan sulfato, fibrinogênio, entre outras. A interação do sistema imune com as DAMPs pode constituir a base molecular da SIRS (CINEL & OPAL, 2009). Em conjunto, pode haver uma sequência de eventos genéticos, bioquímicos e clínicos: haverá febre, adinamia, bem como sintomas gerais de inflamação/infecção (por ação das citocinas sobre o hipotálamo), elevação da

proteína C-reativa e complemento (por ação de citocinas sobre o fígado), ativação endotelial com disfunção microcirculatória, aumento da permeabilidade vascular, ativação da cascata das cininas, microtrombose e redução da resistência vascular sistêmica (NGUYEN et al., 2004; ARNOLD et al., 2008).

A sepse está associada com uma forte ativação do sistema imune inato que é mediada pela ativação de PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrões) por PAMPs e DAMPs. Os PRRs interagem com diversos PAMPs e DAMPs e esta diversidade provavelmente pode explicar a semelhança entre as reações inflamatórias induzidas por diferentes patógenos e os causados por diferentes tipos de lesões, infecciosas ou não infecciosas (CHAN, 2012; DEUTSCHMAN & TRACEY, 2014).

Um indivíduo com sepse pode perder cerca de 10% do peso corporal em poucas semanas de doença. A redução do retorno venoso, hipotensão e redução do débito cardíaco, além da trombose microvascular associados produzem menor oferta de oxigênio aos tecidos e anaerobiose, com aumento progressivo da lactacidemia. A elevação do lactato sérico pode ser indício de baixa perfusão tecidual e este associada à alta mortalidade na sepse. O lactato sérico, portanto, pode ser usado como marcador de gravidade bem como no manejo clínico da sepse, dado que medidas terapêuticas instituídas para promover a depuração de lactato sérico precocemente, estão associadas a melhor prognóstico do paciente séptico (NGUYEN et al., 2004; ARNOLD et al., 2008).

Uma alteração do controle genético na cadeia oxidativa mitocondrial estabelece redução do aproveitamento de oxigênio ofertado aos tecidos, e esse fenômeno é conhecido como hipóxia citopática (FINK, 2001).

Desta forma a redução oferta de oxigênio aos tecidos pode ser um fator fortemente associado às disfunções orgânicas da sepse e, quando otimizada precocemente, há significativa redução da morbimortalidade da sepse grave e choque séptico (NGUYEN et al., 2004; ARNOLD et al., 2008).

2.2 Estresse oxidativo na sepse

O organismo pode possuir um complexo sistema de proteção antioxidante, como mecanismo de defesa contra os radicais livres, que podem ser formados constantemente no metabolismo celular normal e em vários eventos patológicos e,

quando em excesso, podem ocasionar a oxidação de moléculas biológicas. O desequilíbrio entre o desafio oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo pode ser denominado de estresse oxidativo, um dos responsáveis pela síndrome da resposta inflamatória sistêmica capaz de causar danos a órgãos distantes (MACHADO et al., 2009).

A oxidação pode ser considerada uma parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo celular, produzindo radicais livres de forma natural ou por uma disfunção biológica, segundo Halliwell & Gutteridge (1999), o estresse oxidativo é um fenômeno que ocorre quando há um aumento líquido dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerado por um desequilíbrio entre a produção destas espécies e as defesas antioxidantes do organismo.

O estresse oxidativo pode ser um dos vários e mais importantes mecanismos envolvidos na fisiopatologia da sepse. A geração maciça de espécies reativas de oxigênio durante a sepse compromete as funções bem como a sobrevivência da célula, especificamente agindo sobre a mitocôndria e alterando a fosforilação oxidativa por meio da inibição dos complexos enzimáticos, gerando mais EROs e tendo como desfecho final a diminuição da produção energética mitocondrial que por fim culmina com morte celular (BROWN & COOPER, 1994; BOLANOS et al., 1996; CLEMENTI et al., 1998; SIAMI et al., 2008). Os possíveis efeitos das EROs sobre as células incluem o dano oxidativo à proteínas, carboidratos, lipídios e ao DNA (HALLIWELL, 1994; THOMAS, 2003; JONES & KUBOW, 2003).

Os radicais livres podem ser considerados como moléculas altamente reativas e que possuem elétrons não pareados em sua estrutura (ARSALANI-ZADEH et al., 2009; CAROCHO & FERREIRA, 2013). Eles podem ser continuamente produzidos no organismo pelas mitocôndrias, leucócitos e a xantina oxidase (ARSALANI-ZADEH et al., 2009). Estas moléculas podem ser derivadas do oxigênio (ânion superóxido, hidroxil, peroxil, hidroperoxil, peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso), do nitrogênio (óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, peroxinitrito, óxido nitroso e peroxinitrato) (EDEAS, 2011), ou do enxofre (dissulfureto, monóxido e dióxido de dissulfureto, ácidos sulfênico e sulfínico) (CAROCHO & FERREIRA, 2013). Via de regra os radicais livres têm a meia-vida muito curta e reagem de forma rápida e inespecífica com diversos alvos e compostos celulares (SIES, 1991), sendo as espécies derivadas do oxigênio consideradas as mais importantes do ponto de vista biológico (VALKO et al., 2007).

Os principais alvos dos radicais livres podem ser as estruturas celulares, os ácidos nucleicos, as proteínas e os lipídeos (VALKO et al., 2007). As proteínas podem ser modificadas por oxidação de aminoácido específico, oxidação de peptídeos mediada por radicais livres e pela formação de ligações cruzadas de proteína devido à reação com produtos de peroxidação lipídica. Já o dano causado aos ácidos nucleicos é químico e estrutural. No caso dos açúcares, há formação de radicais que numa reação em cadeia resultante pode levar a formação de moléculas mutagênicas (CAROCHO & FERREIRA, 2013). O principal produto resultante da peroxidação lipídica é o malondialdeído (VALKO et al, 2007), referida substância reativa do ácido tiobarbitúrico (VAJDOVICH, 2008), considerado molécula mutagênica para células bacterianas e de mamíferos, e cancerígena para células de ratos, (VALKO et al., 2007).

O estresse oxidativo tem sido implicado na doença humana por um corpo crescente de evidências científicas (BJELAKOVIC et al., 2007). No entanto, as células apresentam múltiplos mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo e obtêm sucesso na prevenção de danos celulares, na medida da efetividade destes mecanismos. Contudo, o estresse oxidativo ocorre quando as defesas antioxidantes não são completamente eficientes para combater a formação de EROs (CARVALHO et al., 2003).

Durante a sepse, ocorre uma explosão de radicais livres levando a um estresse oxidativo intenso, e além do aumento de substâncias pró-oxidantes, ocorre uma redução dos estoques antioxidantes corporais. Segundo alguns estudos realizados em modelos animais, os antioxidantes endógenos como a vitamina C e E, β -caroteno, catalase, e superóxido dismutase, são insuficientes para neutralizar a quantidade de radicais livres produzidos e tão pouco neutralizar o dano celular na síndrome da resposta inflamatória sistêmica, (CARVALHO et al., 2003).

A consequência do estresse oxidativo durante a sepse é o imediato dano celular que culmina com a falência múltipla de órgãos (TAYLOR & PIANTADOSI, 1995), podendo levar à morte celular (MEYDANI et al., 1995). O estresse oxidativo também é capaz de induzir à oxidação lipídica e, na presença de oxigênio, ocasionar a peroxidação lipídica de membranas celulares (OZATA et al., 2002; JONES & KUBOW, 2003). Na sepse, a capacidade celular anti-estresse oxidativo está reduzida (COWLEY, 1996). As causas das manifestações clínicas mais importantes da sepse além da invasão de patógenos, é a hipotensão e falência de órgãos que resultam de uma

desregulação de mediadores inflamatórios e produção excessiva de EROs proveniente do hospedeiro (CROWTHER & MARSHALL, 2001).

Na terapia inicial da sepse são utilizados antimicrobianos de amplo espectro de ação, que infelizmente não são suficientes para o controle da infecção e da resposta imune no paciente, para isso são necessárias associações com outras medidas terapêuticas, por isso tornam-se viáveis estudos sobre o uso combinado de antimicrobianos com antioxidantes para obter um maior sucesso na terapia da doença (PEREIRA JUNIOR et al., 1998; CARVALHO et al., 2003).

2.3 Antioxidantes na sepse

Em pacientes com sepse, as primeiras horas são de valiosa importância para a evolução da sepse. Terapias de suporte como corticosteroides, terapia nutricional, imunomoduladores e antioxidantes na UTI são essenciais para trazer benefícios necessários na mudança do desfecho da sepse (PEREIRA JUNIOR et al. 1998; MENDES, 2011).

Antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas com o agente oxidante, de modo significativo, reduzem ou previnem a oxidação do substrato (molécula). Diferentes antioxidantes são necessários para proteção contra o estresse oxidativo (BLOKHINA et al., 2003).

Para minimizar o efeito deletério das EROs existe um complexo sistema de defesa antioxidante, o qual intercepta estes radicais para formar menos compostos reativos (OZATA et al, 2002).

Os antioxidantes ainda podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas com aquelas dos substratos oxidáveis, retarda ou inibe significativamente a oxidação desses substratos (HALLIWELL, 1995).

Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos (Quadro 4), (SIES, 1993).

Quadro 4: Principais agentes de defesa antioxidante.

Não enzimático	
α-tocoferol (vitamina E)	L-cisteína
β-caroteno	Curcumina
Ácido ascórbico (vitamina C)	Enzimático
Flavonóides	Superóxido dismutase
Proteínas do plasma	Catalase
Selênio	NADPH-quinona oxidoreductase
Glutathione	Glutathione peroxidase
Clorofilina	Enzimas de reparo

Fonte: Adaptado de SIES, 1993.

Já existem algumas tentativas de utilizar antioxidantes como adjuvante no tratamento da sepse ou desordens inflamatórias sistêmicas (ANGSTWURM et al., 1999; REMICK et al., 2003). Vulcano et al, (2000) demonstraram que o uso de quelantes de ferro pode diminuir a mortalidade induzida em modelo de sepse por endotoxina. Em outros estudos, Hamburger e McCay em 1989 já demonstraram que o uso de nitronas reduz a mortalidade induzida por endotoxinas em ratos. Em modelos animais de choque séptico o uso de miméticos de SOD (enzima superóxido dismutase) reduz a resposta inflamatória (por reduzir a ativação de NF-κB e a expressão das citocinas e moléculas de adesão associadas), diminuem a ativação da PARs (*protease-activated receptors*), e o dano celular. Além disso, eles também reduzem a hiporreatividade vascular por reduzir a inativação das catecolaminas pelo superóxido, reduzindo a mortalidade em modelos animais relevantes de choque séptico (SALVEMINI et al., 1999; MASINI et al., 2003).

2.4 N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto de tiol (contendo sulfidril) com um potente efeito antioxidante e como fonte de grupos sulfidril nas células, é formado pela seguinte fórmula química $C_5H_9NO_3S$ (figura 3) possui peso molecular $163,2 \text{ g.mol}^{-1}$ e é amplamente usado na clínica médica (ZIMENT, 1998). A NAC age como um

antioxidante diretamente, através dos seus radicais de tiol, e indiretamente, pela reposição de estoques celulares diminuídos de glutathiona. (SAPATEN, 2004). Desta forma podemos dizer que a NAC age diretamente no combate aos radicais livres mediante interação com o radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (KELLY, 1998), e indiretamente mediante a indução da síntese de glutathiona, cuja principal função é a remoção de radicais livres e defesa contra o estresse oxidativo (KELLY, 1998; FISHBANE et al., 2004).

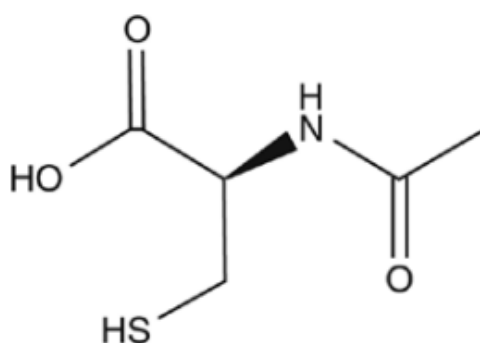


Figura 3: Estrutura molecular da N-acetilcisteína. (TEPEL, 2003).

Segundo De Flora et al, (1991), a NAC tem sido utilizada terapeuticamente devido à sua propriedade de ser um precursor da glutathiona, deste modo, possui, portanto, um papel-chave na homeostase celular, visto que a depleção de glutathiona pode causar morte celular devido à peroxidação lipídica e declínio nos níveis de tiol-proteínas (REED et al., 1984). NAC também pode atuar diretamente reduzindo os níveis de ROS *in vivo* e *in vitro* (ARUOMA et al., 1989).

A NAC consiste em um metabólito facilmente transportado para o interior das células, onde aumenta a concentração de tióis, primeiramente de glutathiona reduzida (GSH) através da sua desacetilação com consequente liberação de cisteína, segundo Pinho et al, (2005), a NAC é doadora de grupos tióis que atua como um precursor da cisteína intracelular, aumentando a produção de GSH, quando a demanda de GSH está aumentada, como durante excessivo estresse oxidativo ou durante certos processos patológicos (CETINKAYA et al., 2005). O fato de liberar cisteína indica que seu mecanismo antioxidante está fortemente associado à sua propriedade de remover espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A NAC fornece o grupamento - SH

estimulando o sistema glutathione e suas enzimas, principalmente a glutathione sintetase para síntese da glutathione reduzida (GSH) tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TUMUR, 2010). Corroborando com essa afirmação, segundo De Vries & De Flora (1993), a maioria dos efeitos benéficos da NAC é sugerida como sendo um resultado de sua habilidade tanto de reduzir cistina extracelular em cisteína ou ser uma fonte de grupos tióis.

A NAC pode atuar no metabolismo mitocondrial influenciando a fosforilação oxidativa (MIQUEL et al., 1995). Ela também pode atuar na fosforilação oxidativa através de dois mecanismos: protegendo proteínas da fosforilação oxidativa contra o dano oxidativo através da manutenção dos grupos SH que são essenciais para a atividade enzimática e evitando a peroxidação lipídica das membranas mitocondriais, o que poderia diminuir a atividade dos complexos (BANACLOCHA et al., 1997).

Seu potencial anti-inflamatório pode ocorrer pela inibição da ativação, agregação plaquetária e quimiotaxia de neutrófilos, supressão e ativação de macrófagos, inibição da adesão celular leucócito-endotelial e atenuação da liberação de TNF- α e IL-8, provavelmente por modular a expressão gene destes mediadores no nível transcripcional. (SAPATEN, 2004).

Devido a essas propriedades, a NAC tem sido utilizada não só como um agente mucolítico em uma variedade de doenças respiratórias, mas também em condições caracterizadas pela diminuição da glutathione ou estresse oxidativo, além disso, a NAC mostrou ser capaz de melhorar o fluxo sanguíneo da microcirculação em tabagistas e a vasodilatação coronariana, além de aumentar a dilatação periférica dependente do endotélio em pacientes submetidos a cateterismo cardíaco e de melhorar a função endotelial em pacientes em diálise (ANDREWS et al., 2001; YILMAZ et al., 2007; LU et al., 2001).

Também há evidências sugerindo que a NAC pode ter um papel na sobrevivência neuronal através de outros mecanismos não relacionados com suas propriedades antioxidantes, por exemplo, inibindo apoptose (FERRARI et al., 1995, XIONG et al., 1999). A NAC como já foi descrita, tem sido utilizada vastamente como antioxidante *in vivo* e *in vitro* (CETINKAYA et al., 2005), na clínica, ela tem sido utilizada no tratamento de algumas situações de overdose de alguns fármacos, como por paracetamol, considerado aqui como padrão-ouro (PRESCOTT et al., 1979) na expectoração como mucolítico (DE FLORA et al., 2001) e na prevenção da nefropatia induzida por contraste (TEPEL et al., 2000). Também tem sido demonstrado que a NAC apresenta um efeito atenuante e até preventivo em relação aos radicais livres

como, por exemplo, o ácido hipocloroso, os radicais hidroxila e o peróxido de hidrogênio (SHAIK, 2006), devido ao grupo sulfidrílico presente em sua estrutura química. Assim, a NAC pode ser parcialmente comparada à atividade de enzimas antioxidantes endógenas como a superóxido dismutase, catalase e glutational peroxidase, apesar dessas últimas apresentarem maior capacidade de desintoxicação se comparadas a sua ação direta. Além disso, foi descrito que esta droga é capaz de aumentar a capacidade de reparo no DNA e também promove a indução da apoptose seletiva de células em transformação. Estudos também indicam que NAC reduz disfunção endotelial, inflamação e fibrose em pacientes renais crônicos, com evidente de melhora clínica (MASSY, 2009). Somando-se a isso, esta droga promove o decréscimo da produção de citocinas como o TNF- α com a diminuição do estresse oxidativo e/ou aumento da superóxido dismutase. (CHEN, 2006). Diferentes testes clínicos já confirmaram os benefícios da utilização de NAC em diferentes patologias inflamatórias neurodegenerativas e na modulação da dor (PEREZ et al., 2003). Com efeitos preventivos, a NAC tem-se mostrado bastante eficiente como protetor em doença renal crônica, câncer, insuficiência pulmonar, no tratamento da AIDS e outras doenças (NOLIN, 2010).

Devido a esses fatores a NAC também é utilizada como ferramenta em estudos de estresse oxidativo e em processos inflamatórios como a sepse. O tratamento de camundongos com NAC diminui a expressão de moléculas de adesão em leucócitos (BIRNBAUM et al., 2008) e conseguiu reduzir a mortalidade dos animais na sepse experimental (MELLO et al., 2011).

2.5 Modelos experimentais para o estudo da sepse

Os modelos experimentais de sepse mais conhecidos são: administração endovenosa ou intraperitoneal de bactérias vivas ou de componentes microbiano, o modelo de injúria com consecutiva liberação da microbiota intestinal por ligadura e perfuração do ceco (CLP).

O modelo que mais se aproxima de um quadro de sepse humana é o modelo de agressão ao intestino, com consequente liberação de flora microbiana. Este modelo é denominado de ligadura e perfuração do ceco (CLP, do inglês, *cecal ligation and puncture*), e seu variante, o CASP (do inglês, *colon ascendens stent peritonitis*,

peritonite causada por cateter no cólon ascendente), ele se caracteriza pela liberação gradativa do conteúdo bacteriano cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse moderada, sepse grave e choque séptico (WICHTERMAN et al., 1980; BENJAMIM, 2001).

O CLP tem se mostrado o melhor para indução da sepse, ele é o mais empregado nas pesquisas científicas, além de se assemelhar com a progressão e características da sepse humana por isso têm contribuído para o conhecimento do envolvimento de componentes da imunidade nesta síndrome, incluindo a identificação de novos potenciais alvos terapêuticos (DEJAGER et al., 2011).

Este modelo foi desenvolvido em 1980 por Wichterman e colaboradores e consiste na exposição do ceco, seguida de ligadura e perfuração abaixo da válvula íleo-cecal, com extravasamento de fezes para a cavidade abdominal (Figura 5). Seus efeitos são semelhantes aos de uma apendicite supurada. De acordo com Andrades et al (2005), a intensidade dos danos causados pela sepse induzida pelo modelo CLP é determinada pelo número de perfurações realizadas e pelo diâmetro da agulha utilizada e segundo Benjamin et al (2000), de acordo com o tamanho e o número de perfurações, os animais evoluem para diferentes perfis de morbimortalidade e pode-se classificar o CLP como letal ou sub-letal. Kuhlmann (1994) sugere que a sepse pode ser classificada quanto a sua gravidade utilizando-se a taxa de mortalidade do grupo experimental estudado. Desta forma, para obtenção de uma sepse não letal (0-10% de mortalidade), sub-letal (40-60% de mortalidade), e letal (90-100% de mortalidade), para que assim seja avaliada a correlação entre gravidade da sepse e os efeitos citotóxicos decorrentes desta patologia. Estudos sugerem que a resposta do grupo submetido à sepse letal aparece, primariamente, desenvolvendo um maior estresse oxidativo e causa uma mortalidade alta, em torno de 90%, em 10 dias (ANDRADES et al., 2005).

Uma das maiores diferenças entre os modelos que utilizam LPS comparados aos de agressão intestinal, é que este último induz um quadro de sepse polimicrobiana, mantém a presença de um foco infeccioso e ainda recriam de maneira muito similar as fases hemodinâmicas, metabólicas, hiper e hipoinflamatórias, observadas durante a sepse (DEJAGER et al., 2011).

O modelo utilizado neste trabalho foi o de CLP, por ser um modelo de injúria semelhante ao quadro de sepse em humanos, sobretudo decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória, como foi dito. Nesse modelo, após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do

conteúdo colônico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (WITCHERMANN et al., 1980; BAKER et al., 1983; BENJAMIM, 2001).

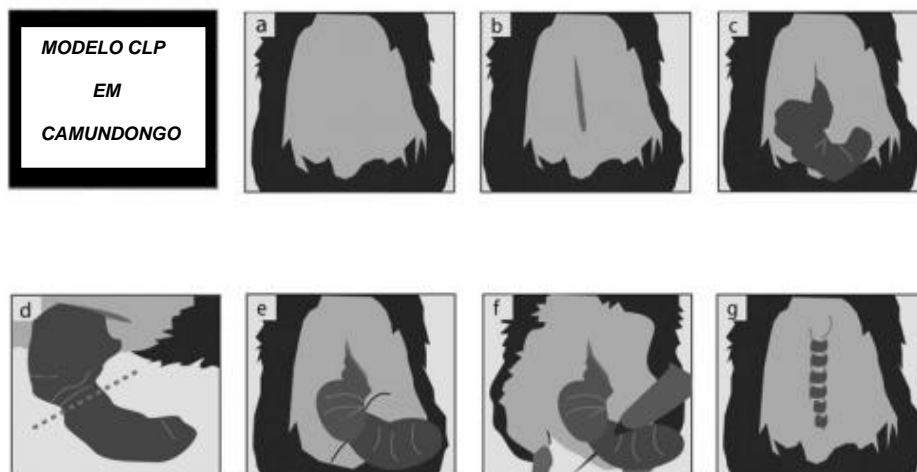


Figura 4: Esquema do procedimento do modelo CLP em roedores segundo (ZAPPAROLI et al., 2011).

As características acima descritas, aliadas à facilidade da execução, tornaram o CLP um dos modelos mais utilizados para o estudo da sepse, porém apesar de reproduzir com maior fidelidade a condição patológica humana, é o modelo que causa mais sofrimento aos animais, pois é um procedimento invasivo, em que há ruptura do ceco com o vazamento do conteúdo cecal para o peritônio (WICHTERMAN et al., 1980)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da NAC sobre a evolução da sepse polimicrobiana induzida por ligação e perfuração do ceco de camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito do uso da NAC sobre a sobrevivência de camundongos submetidos à CLP.
- ✓ Avaliar o efeito do uso da NAC sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos submetidos à CLP.
- ✓ Determinação da carga bacteriana no sangue, pulmão e exsudato peritoneal de camundongos submetidos à CLP e tratados com NAC.
- ✓ Avaliar o efeito do uso da NAC sobre a infiltração de neutrófilos no pulmão de camundongos submetidos à CLP e tratados com NAC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais.

Para a realização dos experimentos foram utilizados no total de quarenta e oito camundongos da linhagem Swiss, machos, pesando entre 18-22g, provenientes do biotério da Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande/MS. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em condições de temperatura (23-25°C) e o ciclo claro/escuro, controlados, com livre acesso à ração e água. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas de experimentação envolvendo animais, preconizadas pelo Comitê de Ética (CEUA 014/2016).

4.2 Realização do Modelo experimental de ligação e perfuração do ceco (CLP).

Para indução da sepse foi utilizado o modelo de ligação e perfuração do ceco melhor descrito por (WICHTERMAN et al.; BAUE; CHAUDRY, 1980) com algumas modificações.

Os camundongos foram anestesiados com Cetamina e Xilazina (150mg/kg e 7,5mg/kg) pela via i.p., após isso foi feita a tricotomia com máquina de barbear e assepsia com tintura de iodo 2% na região do abdômen. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, grupo 1 (sepse letal), grupo 2 (sepse subletal), grupo 3 (sepse letal tratados com NAC 300mg/kg) e grupo 4 (sepse subletal tratados com NAC 300mg/kg).

Na cirurgia foi feita uma incisão de 1 cm no abdômen e o ceco foi exposto e ligado com fio não absorvível abaixo da válvula ileocecal, sem obstrução total. Após a ligadura, o ceco dos animais dos grupos 2 e 4 foi perfurado (agulha 26G) por duas vezes para se obter uma peritonite moderada (até 40% de mortalidade), os animais dos grupos 1 e 3 tiveram o ceco perfurado (agulha 21G) por seis vezes para se obter uma peritonite grave (de 90 a 100% de mortalidade). Em seguida, em todos os grupos,

o ceco dos animais foi pressionado gentilmente para facilitar a saída de conteúdo fecal pelas perfurações, e o ceco então foi devolvido ao abdômen, sendo realizada sutura sobre a incisão, e logo após o procedimento cirúrgico, os animais receberam uma reposição volêmica com 1 mL de solução salina estéril por via subcutânea.

4.3 Avaliação da sobrevida de animais submetidos à sepse tratados ou não com NAC.

Para tanto, um primeiro grupo de animais submetidos à sepse microbiana foram acompanhados por sete dias para avaliação da sobrevida. Esses animais foram separados em quatro grupos experimentais com cinco animais em cada grupo, eles foram divididos nos grupos (seguindo o protocolo da CLP descrito no item 4.2) sepse letal, sepse letal tratados com NAC, sepse subletal, e sepse subletal tratados com NAC. Os grupos tratados receberam a dose de 300mg/Kg de NAC a por via subcutânea a cada 24h, de acordo com a sobrevivência de cada indivíduo. Lembrando que a avaliação da sobrevida foi um experimento realizado antes de todos os outros testes, para os outros testes usamos outro grupo de animais, visto que para essa avaliação após o período de sete dias os camundongos que permaneceram vivos foram eutanasiados. Deste modo a avaliação da sobrevida dos animais foi expressa como porcentagem de animais sobreviventes e o teste χ^2 foi utilizado para determinar as diferenças entre as curvas de sobrevida.

4.4 Tratamento com NAC.

Para uma nova análise, com outro grupo de animais foi realizado novamente o modelo experimental (CLP), utilizando-se dos mesmos quatro grupos ditos anteriormente (sepse letal, sepse letal tratados com NAC, sepse subletal, e sepse subletal tratados com NAC). Nestes grupos o tratamento foi realizado após 30 minutos da cirurgia de CLP, apenas nos grupos tratados respectivamente. Os grupos receberam o tratamento na dose de 300mg/Kg de NAC, por via subcutânea, de acordo com a média de peso de cada grupo.

4.5 Obtenção das amostras experimentais.

Após 6h da realização do modelo experimental, os animais de todos os grupos experimentais foram anestesiados novamente, desta vez em dose letal, para obtenção de todas as amostras para as análises do trabalho.

4.5.1 Coleta de sangue dos animais experimentais.

A coleta de sangue foi realizada logo após a anestesia em dose letal, antes da morte do animal, por punção cardíaca. A amostra foi utilizada para realização de ensaio de proteção (determinação das Unidades Formadoras de Colônia).

4.5.2 Quantificação de bactérias e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) do sangue.

O grau de infecção foi determinado através da contagem do número de UFCs presentes no sangue dos animais submetidos ao CLP. O sangue sem diluição, na quantia de 10 µl foi semeado em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories). Após o semeio, as placas foram incubadas por 18h a 37 °C. Todo o procedimento foi feito sob condições estéreis. A determinação do número de UFC foi realizada em contador automático de colônias e os resultados foram expressos como Log_{10} UFC. mL^{-1} do sangue.

4.5.3 Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais submetidos à sepse.

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes graus de sepse, tratados ou não, foi avaliada em tempo determinado de 6 horas após as cirurgias. Os animais foram sacrificados imediatamente após a coleta de sangue e a cavidade peritoneal foi aberta e as células peritoneais foram assepticamente coletadas com 3 mL de PBS / EDTA K3 (5%). A partir do exsudato foram feitas amostras para as contagens total e diferencial das células, para a determinação da atividade da enzima mieloperoxidase e para a

realização de ensaio de proteção (determinação das Unidades Formadoras de Colônia).

4.5.4 Contagem total das células.

A contagem total das células foi realizada em câmara de Newbauer, logo após a coleta do exsudato peritoneal, 20 µl do mesmo foi homogeneizado com 380 µl de líquido de Turck, e o resultado foi expresso como número de células $\times 10^5$ / mL.

4.5.5 Contagem diferencial.

A contagem diferencial foi realizada pela análise de esfregaços feitos a partir dos exsudatos peritoneais obtidos após 6 horas da cirurgia. As lâminas foram coradas em corante panótico rápido (Diff Quik). As células foram examinadas em microscópio óptico em objetiva 100x com imersão em óleo. Foram diferenciados três tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos e mononucleares. A quantidade de cada tipo celular presente na cavidade peritoneal foi determinada como a porcentagem celular específica frente ao número total de células. Os resultados foram expressos como número de células $\times 10^5$ por mililitro.

4.5.6 Quantificação de bactérias e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) do lavado peritoneal.

O grau de infecção foi determinado por meio da contagem do número de UFCs presentes no lavado peritoneal dos animais submetidos ao CLP. O lavado peritoneal foi diluído (1:1; 1:10; 1:100) em PBS estéril e 10 µl dessa solução foi semeada em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories). Após isso as placas foram incubadas por 18h a 32 °C. O número de UFC foi determinado pela contagem das colônias em contador automático. Todo o procedimento foi feito sob condições estéreis Os resultados foram expressos como Log_{10} UFC. mL^{-1} de lavado peritoneal.

4.5.7 Coleta de pulmão

Após a eutanásia e coleta do lavado peritoneal o tórax dos animais foi aberto cirurgicamente para a remoção do pulmão. O pulmão esquerdo foi reservado para dosagem de MPO, em tubo de polietileno contendo 100 µl de tampão MPO. As amostras foram mantidas em gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular. Ao termino do experimento as amostras destinadas a dosagem de MPO foram congeladas a -80°C, para posterior análise.

4.5.8 Quantificação de bactérias e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) do pulmão.

O grau de infecção foi determinado através da contagem do número de UFCs presentes no pulmão (lóbulo direito) dos animais submetidos ao CLP. O pulmão foi macerado com auxílio do cadinho em 200µl de salina estéril, e 10 µl do macerado foram semeadas em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories). Após a semeadura, as placas foram incubadas por 18h a 37 °C. Todo o procedimento foi feito sob condições estéreis. A contagem de UFCs foi realizada em contador automático e os resultados foram expressos como $\text{Log}_{10} \text{UFC. g}^{-1}$ de pulmão.

4.5.9 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) para quantificação do infiltrado leucocitário no pulmão.

A intensidade do acúmulo de neutrófilos nos pulmões de animais submetidos a CLP, tratados ou não com NAC foi aferida pelo ensaio da mieloperoxidase (Souza et al., 2001). Para tanto, o pulmão esquerdo foi colocado em 200µL de tampão NaCl 0,1M, NaPO_4 0,02M, NaEDTA 0,012M (Tampão 1) gelado e em pH 4,7 e homogeneizados em Pollytron. O homogeinato foi em seguida centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Foi realizado então um choque hipotônico no centrifugado celular com 600 µl de NaCl 0,2%, seguido por 600 µl de uma solução de NaCl 1,6% e glicose 5%. Depois de nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o “*pellet*” foi ressuspenso em tampão NaPO_4 (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) (Tampão 2) e novamente homogeneizado. A seguir

esse homogeneizado foi congelado e descongelado três vezes e novamente centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 3µL do sobrenadante das amostras de pulmões foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço foram adicionadas 25µL de TMB (“3, 3', 3, 3'-tetramethylbenzidine” – 1,6 mM final na placa) e a placa foi incubada por 5min à 37°C. Logo após, 100 µL de H₂O₂ (0,5 M final na placa) foram adicionados nos poços e a placa foi incubada por mais 5 min à 37°C. A seguir a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (obtidos da cavidade peritoneal 6h após camundongos serem injetados com carragenina e diluídos seriadamente em NaPO₄ 0,08M (1 x 10⁵ neutrófilos/ poço/ 50µL). Foi determinada a absorbância em leitor de ELISA (Spectra Max 250; Molecular Devices) no comprimento de onda de 450nm. Resultados expressos como número de neutrófilos por 100 mg de tecido.

4.6 Análise estatística

Os dados experimentais foram avaliados comparando-se a média dos valores encontrados, por análise de variância (one-way ANOVA) seguida de pós-teste (test *t*) para análise da atividade antibacteriana e teste de Bonferroni para os demais experimentos. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (D.P) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de P<0,05, como determinado utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da curva de sobrevida de animais submetidos à sepse polimicrobiana tratados com NAC.

A sobrevida de animais submetidos à sepse letal e sepse subletal tratados ou não com NAC 300mg/kg foi avaliada durante sete dias. Os animais em sepse letal não tratados apresentaram 100% de mortalidade ao fim de 72 horas após a CLP (Figura 5). Por outro lado, o tratamento diário com NAC 300mg/kg foi capaz de reduzir em 20% a mortalidade dos animais submetidos à sepse letal. Já os camundongos submetidos à sepse subletal que não receberam o tratamento apresentaram 80% de mortalidade até o sétimo dia, enquanto o grupo sepse subletal cujos animais foram tratados com NAC 300mg/kg apresentaram redução na taxa de mortalidade para 40% (Figura 5), sugerindo um papel protetor da NAC na sepse polimicrobiana.

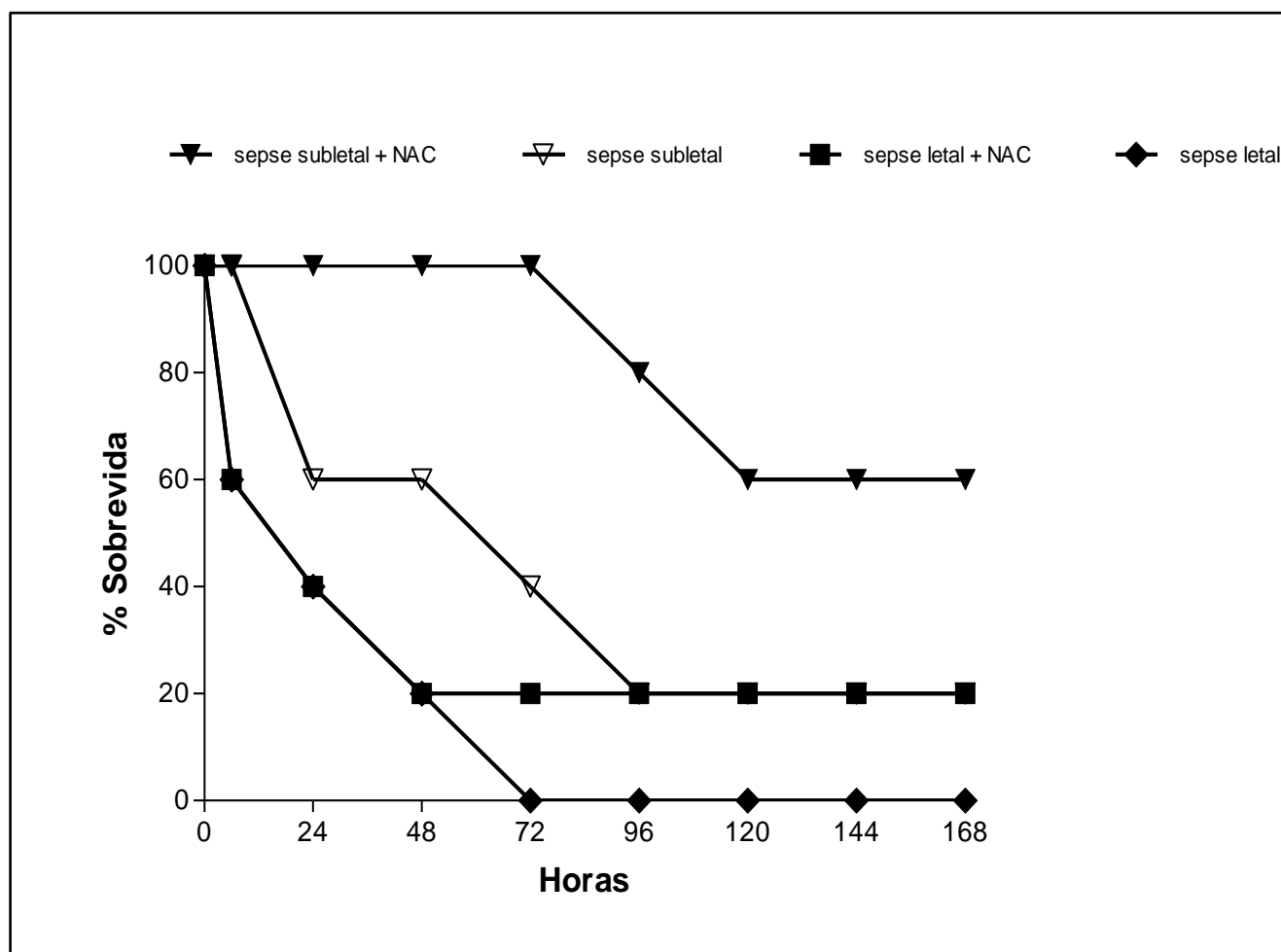


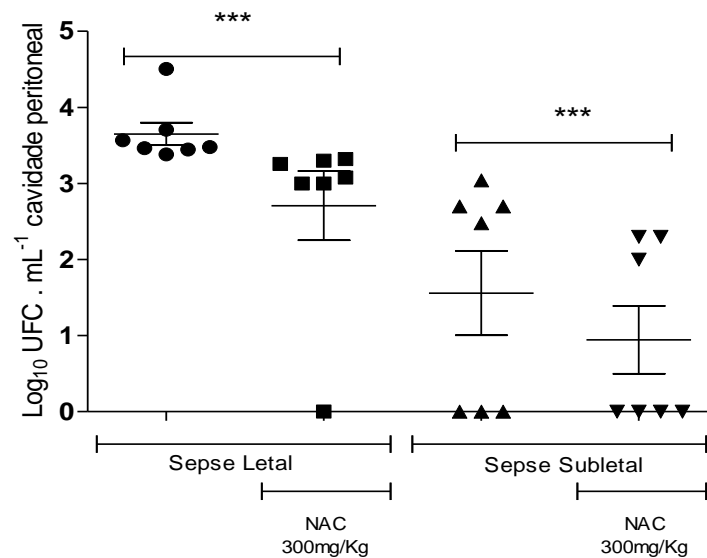
Figura 5. Curva de sobrevida de animais submetidos à sepse letal e sepse sublethal tratados ou não com NAC. Os animais foram submetidos ao procedimento de CLP, divididos em quatro grupos denominados sepse letal, sepse letal tratados com NAC 300mg/Kg, sepse sublethal, e sepse sublethal tratados com NAC 300mg/Kg. Os dados correspondem às porcentagens de sobrevida de cinco animais por grupo.

5.2 Determinação do número de bactérias do lavado peritoneal e do sangue de animais submetidos à sepse polimicrobiana tratados com NAC.

Com o intuito de caracterizar a gravidade da sepse após a indução da sepse por CLP foi avaliada a carga bacteriana no foco infeccioso e na corrente sanguínea de animais tratados ou não com NAC (Figura 6). A quantificação de bactérias no foco infeccioso e na corrente sanguínea foi realizada a partir de amostras coletadas 6h após a cirurgia de CLP.

Os resultados demonstram que o tratamento com NAC foi capaz de reduzir o número de UFCs no peritônio de animais submetidos à sepse letal (Figura 6, painel A). De modo semelhante, o tratamento também reduziu a carga de bactérias no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse subletal (Figura 6, painel A), sugerindo que a NAC é capaz de contribuir para a limitação do foco infeccioso na sepse. Corroborando esses resultados, os dados também demonstram que a NAC foi capaz de reduzir o número de bactérias na corrente sanguínea tanto dos animais submetidos à sepse letal quanto na sepse subletal, quando comparados aos grupos não tratados, sugerindo que a NAC foi capaz de limitar a disseminação sistêmica da infecção na sepse polimicrobiana (Figura 6, painel B), contribuindo para a melhora na taxa de sobrevivência dos animais tratados.

A



B

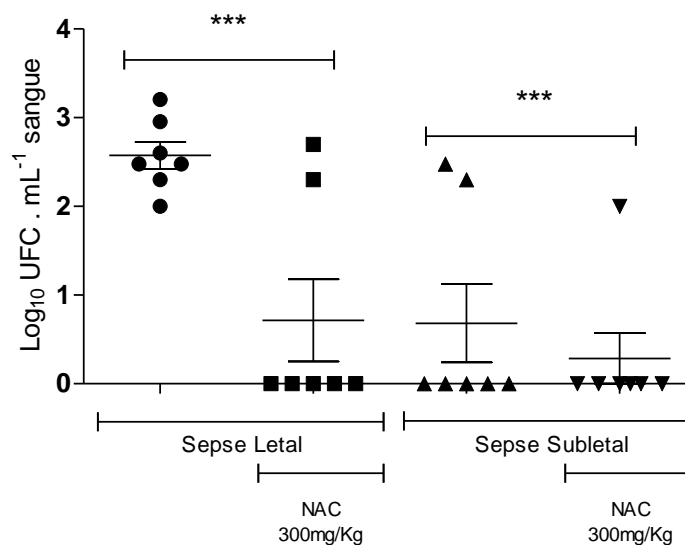


Figura 6. Quantificação bacteriana do lavado peritoneal e do sangue de animais submetidos à sepse letal e sepse subletal tratados com NAC. Painel A: avaliação do número de bactérias presentes no lavado peritoneal de animais submetidos à CLP tratados ou não com NAC, comparação entre os grupos sepse letal e sepse subletal tratados ou não com NAC 300mg/Kg. **Painel B:** Avaliação do número de bactérias presentes no sangue de animais submetidos à CLP tratados ou não com NAC, comparação entre os grupos sepse letal e sepse subletal tratados ou não com NAC 300mg/Kg. A quantificação das bactérias presentes na cavidade peritoneal e no sangue foi realizada a partir de amostras obtidas 6 horas após a cirurgia de CLP, o tratamento foi instituído 30 minutos após as cirurgias CLP nos grupos tratados respectivamente. Realizou-se a contagem das colônias e o número de unidade formadora de colônias (UFC) foram expressas com a escala Log₁₀ UFC . mL⁻¹. Os dados representam sete animais por grupo. *** $p < 0,05$ significância quando comparado grupos tratados e não tratados.

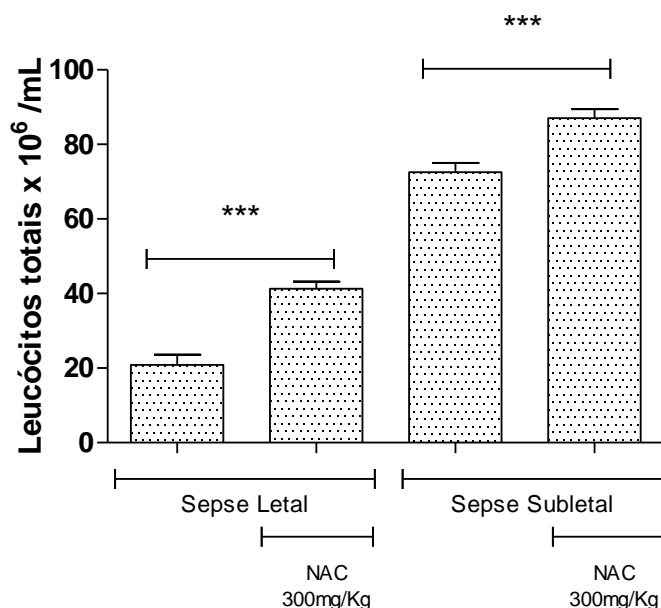
5.3 Avaliação do efeito da NAC sobre a migração de leucócitos totais e de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP.

A migração de leucócitos totais e de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP letal e subletal, com e sem tratamento com NAC foi avaliada 6 horas após a cirurgia (Figura 7).

Na contagem total de leucócitos (Figura 7, painel A) observamos que a NAC promoveu aumento na migração de células leucocitárias nos animais submetidos a sepse letal como não letal, quando comparado aos respectivos grupos controles não tratados, sugerindo que a NAC conseguiu atrair mais células para o local da injúria.

Visto que os neutrófilos são os responsáveis majoritários pela circunscrição de uma infecção e que na sepse grave há falência da migração dessas células para o foco infeccioso, avaliamos a migração de neutrófilos para o foco infeccioso nos animais submetidos a CLP, com e sem tratamento com NAC. Os resultados demonstram que o tratamento com a NAC foi capaz de aumentar em cerca de 50% o número de neutrófilos no foco infeccioso de animais submetidos a sepse letal, quando comparado ao grupo não tratado (Figura 7, painel B). Por outro lado, o tratamento com a NAC dos animais submetidos à sepse não letal aumentou em cerca de 20% a migração de neutrófilos para o foco infeccioso quando comparado aos animais do grupo controle não tratados. Em conjunto os dados sugerem que a redução da carga bacteriana na cavidade peritoneal e na corrente sanguínea de animais submetidos à sepse e tratados com a NAC correlaciona-se com a maior migração de neutrófilos para o foco infeccioso.

A



B

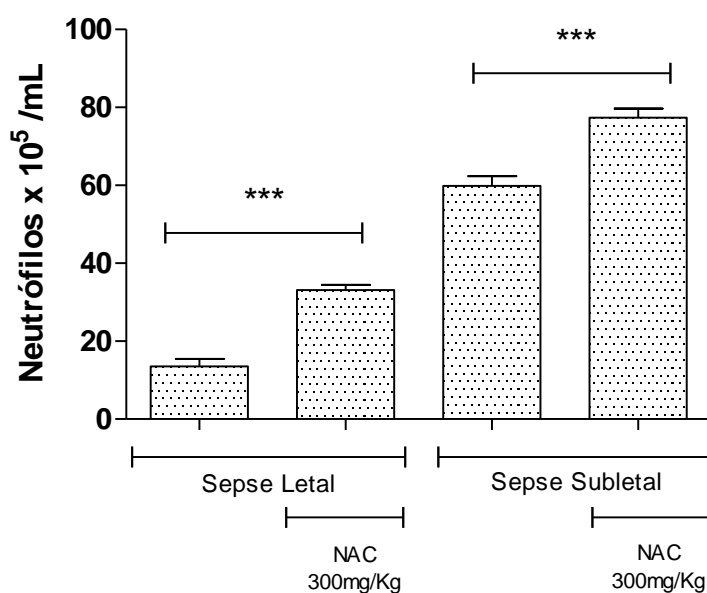


Figura 7. Contagem total de leucócitos e avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais submetidos à sepse letal e sepse subletal tratados com NAC. Painel A: contagem total de leucócitos de animais submetidos à CLP sepse letal e sepse subletal tratados ou não com NAC 300mg/Kg. **Painel B:** Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais submetidos à CLP sepse letal e sepse subletal tratados ou não com NAC 300mg/Kg. A contagem total de leucócitos e migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi avaliada 6 horas após a cirurgia de CLP, dado que nos grupos tratados o tratamento foi instituído 30 minutos após as cirurgias. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais e os resultados foram expressos como leucócitos totais x 10⁶ / mL e número neutrófilos x 10⁵ / mL. *** P<0,05 significância quando comparado os grupos tratados e não tratados.

5.4 Quantificação de bactérias no pulmão de animais submetidos à CLP tratados com NAC.

Uma vez que a função dos pulmões na sepse é precocemente afetada e correlaciona-se com a evolução do quadro, investigamos se o aumento da taxa de sobrevivência dos animais submetidos à sepse e tratados com a NAC foi acompanhado de menor infiltração bacteriana no tecido pulmonar (Figura 8). Novamente a NAC demonstrou efeito sob a proliferação de bactérias, visto que ela foi capaz de reduzi-las nos pulmões de animais submetidos à sepse letal e subletal.

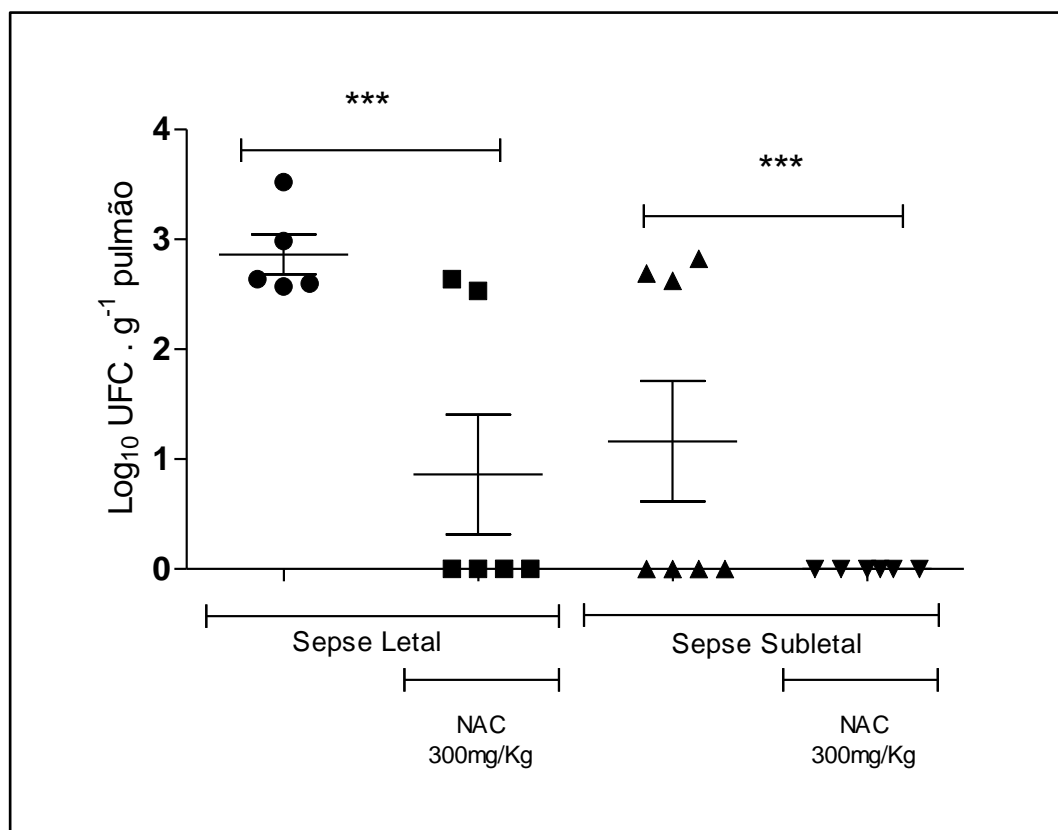


Figura 8. Quantificação bacteriana do pulmão de animais submetidos à sepse letal e sepse subletal tratados com NAC. Avaliação do número de bactérias presentes no pulmão de animais submetidos à CLP tratados ou não com NAC, comparação entre os grupos sepse letal e sepse subletal tratados ou não com NAC 300mg/Kg. A quantificação das bactérias presentes no pulmão foi realizada a partir de amostras obtidas 6 horas após a cirurgia de CLP, o tratamento foi instituído 30 minutos após as cirurgias CLP nos grupos tratados respectivamente. Realizou-se a contagem das colônias e o número de unidade formadora de colônias (UFC) foram expressas com a escala Log₁₀ UFC. mL⁻¹. *** $p < 0,05$ significância quando comparado grupos tratados e não tratados.

5.5 Ensaio da enzima mieloperoxidase (MPO) presente no pulmão de animais tratados ou não com NAC.

Uma vez que a infiltração de neutrófilos em órgãos distantes do foco infeccioso na sepse pode contribuir para a falência de múltiplos órgãos, avaliamos o acúmulo de neutrófilos nos pulmões por meio da quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO). A atividade da MPO foi avaliada 6 horas após a cirurgia de CLP letal e subletal tratados ou não com NAC (Figura 9). O tratamento com a NAC não foi capaz de limitar a infiltração de neutrófilos nos pulmões de animais submetidos à CLP, visto que os dados demonstram que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais tratados e não tratados, tanto na sepse letal quanto na sepse não letal.

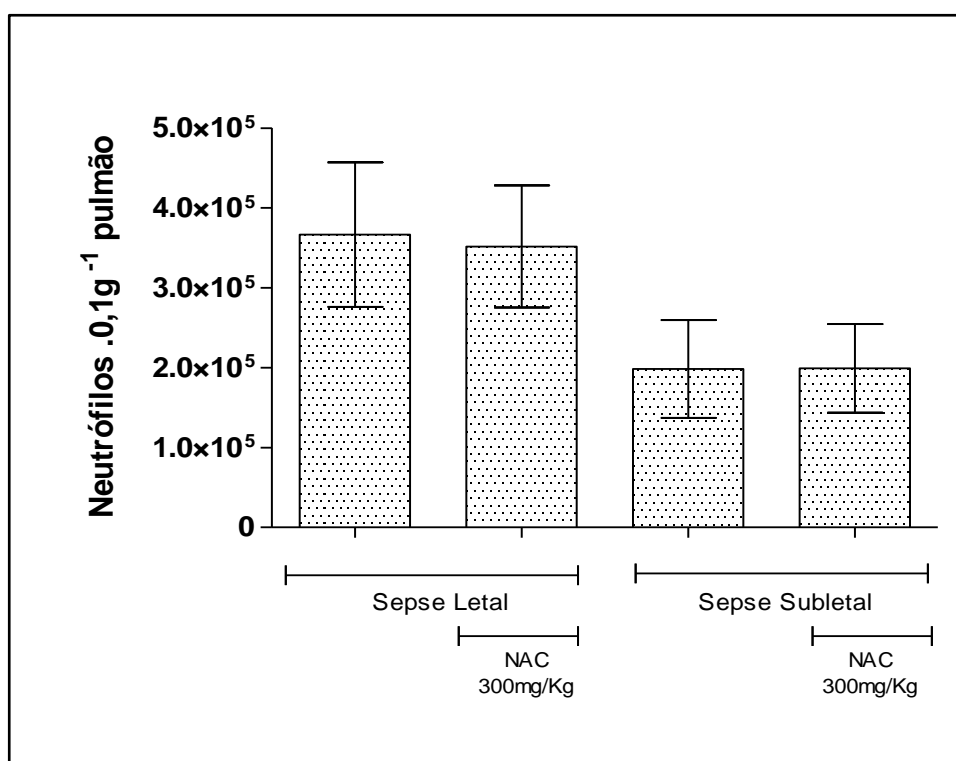


Figura 9. Ensaio da enzima mieloperoxidase (MPO) do pulmão de animais submetidos à sepse letal e sepse subletal tratados com NAC. A atividade da enzima MPO foi avaliada a partir de amostras do pulmão dos animais submetidos à CLP sepse letal e sepse subletal tratados ou não com NAC 300mg/kg, cada amostra foi triturada e passada por várias técnicas de lise celular. Para determinação da atividade da enzima MPO 10µl do sobrenadante após os processos de lise foi colocado em placas 96 poços, foi determinada a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450nm. E os dados foram expressos como número de neutrófilo por 0,1g do pulmão.

6. DISCUSSÃO

O escopo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com a NAC sobre a sobrevida de camundongos submetidos à sepse letal e a sepse subletal induzida pelo modelo de ligação e perfuração cecal (CLP). Além da sobrevida, foram avaliados outros parâmetros como carga bacteriana no foco infeccioso e de modo sistêmico, migração de neutrófilos para o foco infeccioso e infiltrado neutrofílico e de bactérias nos pulmões, visando caracterizar a inflamação sistêmica decorrente da infecção induzida pela cirurgia de CLP e o impacto do tratamento com a NAC sobre esses eventos.

Os modelos de sepse utilizando-se camundongos têm sido bem aceitos junto à comunidade científica por serem reprodutíveis e mimetizarem processos fisiopatológicos observados no ser humano e outros animais durante a sepse, constituindo-se ferramentas importantes na elucidação da fisiopatologia da sepse, bem como na prospecção de novos tratamentos (DEJAGER et al., 2011). Apesar da diversidade de espécies animais, optamos por utilizar camundongos Swiss pelo fato de ser uma linhagem heterogênea de variado repertório de comportamentos individuais e sociais podendo representar melhor a diversidade populacional da espécie humana.

Para indução de sepse, foi escolhido o modelo já consolidado de infecção abdominal polimicrobiana que mais se assemelha à sepse abdominal humana: o modelo de ligação e perfuração do ceco, CLP (DYSON & SINGER, 2009). Criado em 1980 por Wichterman et al., que é descrito como o modelo que mimetiza fielmente os sintomas da sepse em humanos, porém são dificuldades inerentes ao modelo CLP depender de uma cirurgia para realização e o fato de o grau de gravidade da sepse variar conforme a quantidade de fezes que cai na cavidade abdominal e local e tensão da ligadura cecal, fatos estes altamente relacionados às habilidades do pesquisador que o realiza.

Este modelo em roedores vem sendo usado extensivamente na investigação de parâmetros experimentais da sepse e do choque séptico durante as últimas décadas. Ele satisfaz diversos critérios essenciais para um bom modelo de sepse: é um modelo polimicrobiano, possui uma fonte local de infecção, induz septicemia e libera produtos microbianos na periferia do sítio de injúria, sendo também capaz de apresentar uma

grande versatilidade em se adaptar a diferentes graus de severidade e objetivos experimentais (ZAPPAROLI et al., 2011). Portanto, é um modelo valioso para a investigação de diversos aspectos da sepse, tais como, metabolismo, antibioticoterapia, presença de componentes microbianos, respostas cardiovasculares, função imunológica e secreção de mediadores inflamatórios (HUBBARD et al., 2005).

Segundo Benjamin et al (2000), conforme a mortalidade da sepse pode-se classificar o modelo de CLP em subletal ou letal. O modelo de CLP subletal é marcado pelo aumento de neutrófilos na cavidade peritoneal, ao contrário do letal, onde os neutrófilos migram menos, facilitando a ocorrência de infecções secundárias, os autores ainda demonstram que na sepse grave induzida por CLP ocorre à falência de migração neutrofílica para o foco infeccioso, o aumento no número de bactérias no líquido peritoneal e no sangue e, conseqüentemente, uma alta taxa de mortalidade.

Em nossa pesquisa, os animais submetidos a este modelo desenvolveram manifestações da síndrome séptica, tais como resposta inflamatória exacerbada, alterações na contagem de leucócitos, elevada bacteremia e alto índice de mortalidade (HUBBARD et al., 2005), indicando assim, o sucesso na metodologia realizada.

A N-acetilcisteína é usada na clínica há décadas como agente mucolítico e para o tratamento de outras condições como intoxicação por paracetamol e outros fármacos; cardiotoxicidade induzida pela doxirrubicina e nefropatia associada ao uso de radio contrastes (CHERTOFF, 2018). A NAC tem sido apontada como um agente atenuante de doenças sistêmicas como a insuficiência renal crônica, através de diferentes efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (SAGAR, 2008).

Embora a NAC seja uma droga bem conhecida e amplamente empregada em diferentes condições clínicas, seus efeitos sobre a sepse ainda não estão totalmente elucidados e podem ser controversos (CHERTOFF, 2018). Nesse sentido, inúmeros estudos que demonstram seus efeitos positivos tanto em modelos animais de sepse como em pacientes humanos (GALLEY et al., 1997; CRIMI et al., 2006; SENOGLU et al., 2008; MELLO et al., 2011; CHERTOFF et al., 2018). Por outro lado, a literatura é provida de dados que demonstram a ausência de efeitos benéficos na sepse ou ainda, a ocorrência de efeitos deletérios (PEAKE et al., 1996; EMET et al., 2004; VASSILEV et al., 2004; SZAKMANY et al., 2012).

Em nossa análise da taxa de sobrevivência realizada com o modelo CLP (Figura 5), observamos que o tratamento dos animais com NAC foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade tanto na sepse letal no qual se observa aumento da taxa de sobrevivência de

20% em comparação com o grupo letal não tratado no qual não houve sobrevida ao final de 72 horas, como na subletal onde ao final das 168 horas observou-se 60% de sobrevida em comparação 20% de taxa de sobrevida do grupo subletal não tratado. Corroborando nossos resultados, Mello et al (2011), demonstraram que a NAC (150mg/kg) aumentou o tempo e a taxa sobrevida de animais submetidos a sepse induzida por *E. coli*. De modo similar, Kao et al (2006) mostraram que a NAC aumentou em 43% a sobrevida de animais submetidos a sepse letal induzida por LPS.

Da mesma forma, Ritter et al (2004) demonstraram que a NAC 20mg/kg quando associada com a desferoxamina (quelante de Fe^{++}) foi capaz de aumentar em 47% a taxa de sobrevida em ratos submetidos à sepse letal por CLP. Os autores demonstram ainda que a taxa de sobrevida dos animais submetidos à CLP aumentou em 66% quando a NAC e deferoxamina foram associadas a antimicrobianos como a ceftriaxona e clindamicina. Villa et al, (2002) obteve resultados semelhantes, nos quais a NAC (1g/kg) foi capaz de aumentar em cerca de 40% a sobrevida de camundongos submetidos a CLP letal. Em conjunto esses dados reforçam que a NAC pode ser um importante tratamento coadjuvante aos antibacterianos na sepse polimicrobiana, retardando o desenvolvimento do quadro e aumentando a taxa de sobrevida.

Como descrito anteriormente, o tratamento dos animais submetidos à sepse letal e subletal com a NAC foi capaz de reduzir a carga bacteriana tanto no foco infeccioso quanto no sangue. Embora a NAC tenha como principal efeito farmacológico a atividade antioxidante, vários estudos *in vitro* tem demonstrado sua ação sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, tanto na forma plantônica como em sobre biofilmes (PEREZ-GIRALDO et al., 1997; ZHAO & LIU, 2010; ASLAM et al., 2012). Do mesmo modo foi demonstrada a ação da NAC sobre cepas bacterianas clinicamente relevantes, como *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (PEREZ-GIRALDO et al., 1997; MARCHESE et al., 2003; OLOFSSON et al., 2003; ASLAM et al., 2007; ASLAM & DAROUICHE, 2011). No entanto, estudos *in vivo* são escassos, especialmente considerando-se a sepse polimicrobiana.

Apesar dos vários estudos demonstrando a ação antibacteriana da NAC, o mecanismo responsável por esse efeito não está totalmente elucidado.

Por outro lado, apesar das demonstrações da atividade antimicrobiana *in vitro* da NAC, seu perfil farmacocinético *in vivo* faz com que os níveis séricos obtidos após infusão intravenosa sejam menores que aqueles necessários para efetiva ação

antimicrobiana relatada nos estudos *in vitro*, além da sua curta meia vida (5-6 horas), limitando seu tempo de ação sobre bactérias (ASLAM & DAROUICHE, 2001; DRAGO et al., 2013; LEITE et al., 2013; SAMUNI et al., 2013), sugerindo que o efeito do aumento da sobrevida possa estar relacionando a ação da NAC sobre outros eventos na sepse.

Conforme explicitado anteriormente, na sepse grave ou letal observa-se falência na migração de neutrófilos, a qual se correlaciona com maior número de bactérias no foco infeccioso e sangue e consequentemente aumento na taxa de mortalidade (BENJAMIN, 2001; MORENO, 2006). Nesse contexto, conseguimos observar que a NAC foi capaz de estimular a migração de neutrófilos para o foco infeccioso, tanto na sepse letal quanto na sepse não letal. A partir desses resultados hipotetizamos que o aumento da sobrevida dos animais submetidos à CLP poderia estar relacionado à circunscrição da infecção decorrente da efetiva migração de neutrófilos para o local. Reforçando essa hipótese Elferink e Koster (1998), demonstraram que a NAC foi capaz de estimular a migração de neutrófilos *in vitro*. Nesse estudo a NAC apresentou um efeito quimiotático transiente para neutrófilos por um mecanismo dependente de cálcio extracelular e mediado pelo aumento das concentrações de cGMP intracelular.

Da mesma forma Villa et al (2002) demonstraram que o tratamento com a NAC, realizado por via oral a 1g/kg, 45 min antes da indução da CLP em ratos, aumentou a migração células polimorfonucleares para o local da infecção, implicando em menor carga bacteriana na cavidade peritoneal e maior porcentagem de sobrevida. Vale ressaltar que em nosso estudo de avaliação de sobrevida a NAC foi feita na forma de pós-tratamento, com o quadro de sepse já instalado, o que sugere seu papel benéfico no tratamento da sepse e não apenas na limitação da instalação do quadro.

Como dito anteriormente, o curso da sepse depende das relações estabelecidas entre o microrganismo e o hospedeiro. As proteínas e endotoxinas de bactérias reconhecidas por receptores da superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, resultando em na produção e secreção de inúmeras mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, IL-33, TNF- α e TNF- β , INF- γ), derivados do ácido araquidônico e outros. Esses mediadores podem ser responsáveis pelos eventos característicos da sepse, como a SIRS, alterações hemodinâmicas e falência de múltiplos órgãos (PEREIRA JUNIOR et al., 1998; BELLINGAN, 2000; BENJAMIM, 2001; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011 AZIZ et al., 2013).

Os efeitos locais das citocinas envolvem o recrutamento das células que possuem a função de fagocitar o patógeno, deixando uma deficiência para eliminação dos microorganismos, e os efeitos sistêmicos causam danos teciduais ao hospedeiro. Esses danos podem vir a ser hipotensão, trombose, edema pulmonar e hemorragia. Caso o processo não seja interrompido, evolui para falências múltiplas dos órgãos ou até mesmo a óbito. (PEREIRA JUNIOR et al., 1998; CECCON & COSTA VAZ, 2004).

Já foi demonstrado que a NAC pode ter papel antiinflamatório por ser capaz de suprimir a síntese de algumas citocinas (Gül et al., 2011).

Victor et al, (1999) observaram que a NAC (150mg/kg) foi capaz de reduzir a liberação de TNF- α em camundongos induzidos a sepse letal por LPS. Do mesmo modo, Hsu et al, (2006) concluíram que o pós-tratamento com NAC a 150mg/kg pode suprimir a liberação de TNF- α , IL-6 e IL-10 plasmáticos em animais submetidos a sepse por LPS. Senoglu et al, (2008) demonstraram que a administração de NAC (200mg/kg) ocasionou redução TNF- α e IL-6 em ratos submetidos a CLP.

A redução da síntese de mediadores pró-inflamatórios pela NAC parece estar associada com sua capacidade de inibir o fator de transcrição NF- κ B e assim podendo modular a expressão de genes que determinam a síntese de citocinas pró-inflamatórias, a expressão da ciclooxygenase tipo 2 (COX-2), enzima que produz prostaglandinas e de outros mediadores envolvidos na sepse (PEAKE et al., 1996; VICTOR et al., 1999; PINSKY et al., 2003; KOLLS et al., 2006; CHEN et al., 2008; FRAGA et al., 2012; CSONTOS et al., 2012; LEE et al., 2013; WANG et al., 2013).

Na sepse a sobreprodução de substâncias oxidantes pode ser um dos fatores que contribuem para os efeitos deletérios e em última instância, para a falência de múltiplos órgãos e morte (KUMAR et al., 2018). Desse modo, substâncias como a NAC, com ação antioxidante podem desempenhar um papel protetor decisivo.

Recentemente, Chertoff (2018) em uma revisão sobre o papel da NAC na sepse evidenciou os efeitos positivos da utilização desse antioxidante no tratamento da doença em modelo animal, com melhora da sobrevida associada a diversos fatores como aumento da migração de neutrófilos para o sítio da infecção, aumento de glutathione circulante e supressão de algumas citocinas inflamatórias.

Admitindo o benefício do uso da NAC como antioxidante na sepse, foi demonstrado que o estresse oxidativo é significativamente menor e as taxas de sobrevida maiores em ratos sépticos tratados NAC (CAMPOS et al., 2012). Esse efeito benefício pode estar associado ao aumento dos níveis de glutathione induzidos pela

NAC (Gül et al., 201; PEAKE et al., 1996; VICTOR et al., 1999; MOLNÀR et al., 1999; VICTOR et al., 2003; CRIMI et al., 2006; LEE et al., 2013). De fato, foi demonstrado que os níveis plasmáticos e eritrocitários de glutathione estão reduzidos em pacientes no choque séptico e que essa redução correlaciona-se com o aumento da taxa de mortalidade (LEE et al., 2016).

Além disso, a inibição da ativação do fator de transcrição NF-κB pela NAC, que resulta em redução da síntese de citocinas inflamatórias, ocasiona secundariamente a redução da produção de ROS (PEAKE et al., 1996; VICTOR et al., 1999; PINSKY et al., 2003; KOLLS et al., 2006; FRAGA et al., 2012; CSONTOS et al., 2012; LEE et al., 2013).

Os pulmões são os órgãos mais frequentemente afetados durante a sepse, independentemente de o foco infeccioso ser pulmonar ou extrapulmonar (EGGIMANN et al. 2003, PELOSI et al, 2003, MASEWU et al., 2016 ; SEVRANSKY et al., 2008). Diante da importância da manutenção da homeostasia pulmonar no controle da sepse, foi avaliada a carga bacteriana nos pulmões dos animais submetidos ao modelo CLP, a fim de investigar se o tratamento com a NAC teria algum papel protetor. Foi evidenciada uma redução significativa na queda da contagem bacteriana nos pulmões dos animais tratados com NAC, porém não houve diferença no infiltrado neutrofílico entre os grupos analisados. Esses dados podem sugerir que a redução da bacteremia nos pulmões tratados com NAC foi consequência do menor número de bactérias na corrente sanguínea. Por outro lado, o fato da NAC não ter alterado a infiltração pulmonar pode estar relacionada a sua farmacocinética e via de administração intraperitoneal, o que pode ter limitado sua ação ao local de administração. Embora o número de neutrófilos não tenha sido alterado nos pulmões, não podemos descartar efeitos benéficos indiretos da NAC sobre órgão, visto que existem evidências que a NAC possui efeitos benéficos na lesão plumar aguda secundária a sepse. Güreter et al, (2004) descreveram que a administração de NAC (150mg/kg/dia) aumentou significativamente os níveis de glutathione e causou menor lesão no tecido pulmonar de ratos induzidos a CLP. Leef et al (1993) relataram que a NAC causou diminuição do extravasamento pulmonar microvascular e da formação do edema pulmonar com consequente melhora da oxigenação em ratos induzidos a lesão pulmonar aguda.

Não podemos descartar que os efeitos benéficos da NAC podem envolver ação sobre outros tecidos. À vista disso, estudos realizados com a NAC demonstraram seu benefício na melhora da lesão renal aguda isquêmica, e ainda mostrou diminuição dos

níveis de estresse oxidativo e inflamação em órgãos importantes e na disfunção endotelial em modelos animais (DIMARI et al., 1997; RITTER et al., 2004; LAMEIRE, 2005).

Existem relatos que a NAC pode agir como um componente vasodilatador, podendo inibir a agregação plaquetária, acarretando na melhora da microcirculação e oxigenação dos tecidos (SPAPEN et al., 1998; RANK et al., 2000; BUWALDA & INCE, 2002; ATKIMAN, 2002; VICTOR et al., 2004; RITTER et al., 2004; DEL SORBO et al., 2004; CRIMI et al., 2006; DE BAKER et al., 2013; SAUGEL et al., 2015), validando assim seu uso como suporte em pacientes sépticos com alterações na microcirculação. Porém, apesar destes benefícios teóricos, NAC ainda não é recomendado nas diretrizes atuais de sepse (BUWALDA & INCE, 2002; DEL SORBO et al., 2004; SAUGEL et al., 2015).

Considerando todos esses aspectos, podemos sugerir que o uso do antioxidante NAC é de fato benéfico na recuperação do indivíduo com sepse, de várias formas, com mecanismos ainda não explanados, aos poucos, estudos estão sendo realizados com o intuito de avaliar seu mecanismo real em benefício do paciente.

7. CONCLUSÃO

Nossos dados demonstraram que a NAC é capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana, e esse efeito parece estar relacionado com o aumento da migração de neutrófilos para o foco infeccioso e consequente circunscrição da infecção, o que leva ao menos impacto a órgãos distantes do foco infeccioso como os pulmões.

Neste contexto podemos afirmar que essa molécula é um forte candidato a ser incluso como uma droga suporte no tratamento dessa enfermidade.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. New Definitions for Sepsis and Septic Shock: Continuing Evolution but With Much Still to Be Done. **JAMA**; 315(8):757-759, 2016.

ANDRADE, J.L.S. JÚNIOR; DAVID, C.M.; HATUM, R.; et al. Grupo de Estudo de Sepse do Fundo AMIB13, LUIZ,R.R. Sepse Brasil: **Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras**. RBTI, 18 (1): 9-17, 2006.

ANDRADES, M.; RITTER, C.; MOREIRA, J. C.; DAL-PIZZOL, F. Oxidative Parameters Differences During Non-Lethal And Lethal Sepsis Development. **Journal of Surgical Research**. v.125, n.1, p.68-72, 2005.

ANDREWS, N.P.; PRASAD, A.; QUYYUMI, A.A. N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function. **Journal of the American College of Cardiology**; 37:117–23, 2001.

ANGUS, D.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J.; et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated cost of care. **Critical Care Medicine**; [Baltimore] v. 29, n. 7, p. 1303-1310, 2001.

ANGSTWURM, M.W.; SCHOTTDORF, J.; SCHOPOHL, J.; et al. Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory response syndrome improves clinical outcome. **Critical Care Medicine**; 27:1807–1813, 1999.

ARNOLD, R.C.; SHAPIRO, N.I.; JONES, A.E.; et al. **Multi-Center Study of Early Lactate Clearance as a Determinant of Survival in Patients with Presumed Sepsis. Shock**. Dec 22. [Epub ahead of print], 2008.

ARSALANI-ZADEH, R.; ULLAH, S.; KHAN, S.; MACFIE, J. Oxidative stress in laparoscopic versus open abdominal surgery: a systematic review. **Journal of Surgical Research**; 169(1):59-68, 2011.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free radical Biology & Medicine**; 6: 593-597, 1989.

ASLAM, S. & DAROUICHE, R. O. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections. **The International Journal of Artificial Organs**; 34, 752–758, 2011.

ASLAM, S. et al. N-acetylcysteine lock solution prevents catheter-associated bacteremia in rabbits. **The International Journal of Artificial Organs**; 35, 893–897, 2012.

ASLAM, S.; TRAUTNER, B.W.; RAMANATHAN, V.; DAROUICHE, R.O. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm- embedded bacteria on vascular catheters. **Antimicrob Agents Chemother**; 51(4):1556-1558, 2007.

AZIZ, M.; JACOB, A.; YANG, W.L.; et al. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**; v. 93, n. 3, p. 329-42, 2013.

BAKER, C.C., CHAUDRY, I.H., GAINES, H.O., et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**; 94, 331-335, 1983.

BAKKER, J.; ZHANG, H.; DEPIERREUX, M.; VAN ASBECK, S.; VINCENT, J.L. Effects of N-acetylcysteine in endotoxic shock. **Critical Care Medicine**; 9(4):236-243, 1994.

BANACLOCHA, M.M.; HERNANDEZ, A.I.; MARTINEZ, N.; FERRANDIZ, M.L. **N-acetylcysteine protects against age-related increased in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria.** Brain Research 762 (1-2): 256-258, 1997.

BANACLOCHA, M.M. **Therapeutic potential of n-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases.** Medical Hypotheses 56: 472-477, 2001.

BJELAKOVIC, G.; NIKOLOVA, D.; GLUUD, L.L.; et al.: Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention. **JAMA**; 297(8):842-856, 2007.

BELLINGAN, G. Leukocytes: Friend or foe. **Intensive Care Medicine**; 26 Supple 1, S111-8, 2000.

BENJAMIM, C.F. **Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse.** Medicina, Ribeirão Preto, 34:18-26, jan./mar, 2001.

BENJAMIM, C.F.; SILVA, J.S.; FORTES, Z.B.; et al. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infection and Immunity**; 70(7):3602-10, 2002.

BENJAMIM, C.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **Journal of Infectious Diseases**; p.182:214-23, 2011.

BEWICK, T.; SIMMONDS, M.; CHIKHANI, M.; et al. Pneumonia in the context of severe sepsis: a significant diagnostic problem. **Journal European Respiratory Society**; 32:1417–8, 2008.

BIRNBAUM, J; LEHMANN, C. H; KLOTZ, E; HEIN, O.V; BLUME, A; JUBIN, F; POLZE, N; LUTHER, D; SPIES, C. D. Effects of N-acetylcysteine and tirilazad mesylate on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence, mesenteric

plasma extravasation and cytokine levels in experimental endotoxemia in rats. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**; 39(1-4): 99-111, 2008.

BOECHAT, A.L.; BOECHAT, N.O. Sepsis: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira Clínica Médica**; São Paulo. 8(5): 420-7, 2010.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**; 91: 179-194, 2003.

BOOMER, J.S.; TO, K.; CHANG, K.C.; et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. **JAMA**; 306(23):2594–2605, 2011.

BONE, R.C. The pathogenesis of sepsis. **Annals of Internal Medicine**; 115: 457-469, 1991.

BONE, R.C. Immunologic Dissonance: A Continuing Evolution in Our Understanding of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS). **Annals of Internal Medicine**; 125: 680-87, 1996.

BONE, R.C.; BALK, R.A.; CERRA, F.B.; et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of **Critical Care Medicine**; 136(5 Suppl):e28, 1992.

BOLAÑOS, J.P.; HEALES, S.J.; PEUCHEN, S.; BARKER, J.E.; LAND, J.M.; CLARK, J.B. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. **Free Radical Biology & Medicine**; 21(7): 995-1001, 1996.

BROWN, G.C. & COOPER C.E. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. **FEBS Letters**; 19; 356(2-3): 295-8, 1994.

CAMPOS. R.; SHIMIZU, M.H.; VOLPINI, R.A.; et al. N-acetylcysteine prevents pulmonary edema and acute kidney injury in rats with sepsis submitted to mechanical ventilation. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**; 302(7): L640-L650, 2012.

CARVALHO, P. R. A. & TROTTA, E. A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. **Jornal de Pediatria**; Rio de Janeiro. v. 79, nov., 2003.

CAROCHO, M. & FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**; 51:15-25, 2013.

CETINKAYA, A.; BULBULOGLU, E.; KURUTAS, E.B.; CIRALIK, H.; KANTARCEKEN, B.; BUYUKBESE, M.A. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acidinduced colitis in rats. **The Tohoku journal of experimental medicine**; 206(2): 131-9, 2005.

CECCON, M. E. J. R; COSTA VAZ, F.A. Unidade de terapia de cuidados intensivos do instituto da criança, Hospital das clínicas da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. Disponível em. <http://www.pediatriasaopaulo.usp.br>. Acesso em 16 de setembro de 2017.

CHAMBERS, H. **Doenças infecciosas: bacterianas e clamídias**. In: TIERNEY JR, L. M.; MCPHEE, S. J.; PAPADAKIS, M. A.; SCHROEDER, S. A. (Org.). Diagnóstico e tratamento. São Paulo: Atheneu. Cap. 29, p. 29, 1995.

CHAN, J. K. Alarmins: awaiting a clinical response. **Journal Clinical Investigation**; 122, 2711–2719, 2012.

CHAUDHRY, H.; ZHOU, J.; ZHONG, Y.; et al. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. Published in final edited form as: *In Vivo*. 27(6): 669–684, 2013.

CHEN, Q.H.; ZHENG, R.Q.; LIN, H.; WANG, H.L.; LU, N.F.; SHAO, J.; YU, J.Q. The impact of sepsis bundles on mortality in patients with sepsis shock: a prospective clinical study. **Chinese Critical Care Medicine**; v. 20(9), p. 534-537, 2008b.

CHEN, G.; et al. Inhibitory effect on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in rats: a potential neuroprotective mechanism of N-acetylcysteine. **Mediators of Inflammation**; p. 711-858, 2008a.

CHEN, X. L.; DODD, G.; THOMAS, S. U.; ZHANG, X.; WASSERMAN, M. A.; ROVIN, B. H.; KUNSCH, C. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. **AJP - Heart and Circulatory Physiology**; v. 290, p. 1862-1870, 2006.

CINEL, I. & OPAL, S.M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Critical Care Medicine**; 37(1): 291-304, 2009.

CLEMENTI, E.; BROWN, G.C; FEELISCH, M.; MONCADA, S. **Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 7631–7636, 1998.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**; 19-26; 420(6917): 885-91, 2002.

COLLUCI, C. Doença mata aproximadamente 400 mil brasileiros por ano e custa R\$ 17 bilhões anuais ao Sistema Hospitalar. **Jornal Folha de São Paulo**. Caderno Cotidiano, 2006.

COWLEY, H.C.; BACON, P.J.; GOODE, H.F, et al.: Plasma antioxidant potential in severe sepsis: A comparison of survivors and nonsurvivors. **Critical Care Medicine**; 24: 1179- 1183, 1996.

CRIMI, E.; SICA, V.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; et al. The role of oxidative stress in adult critical care. **Free Radical Biology and Medicine**; 40(3): 398-406, 2006.

CROSS, A. S.; SAKARYA, S.; RIFAT, S.; HELD, T. K.; DRYSDALE, B. E.; GRANGE, P. A.; CASSELS, F. J.; WANG, L. X.; STAMATOS, N.; FARESE, A.; CASEY, D.; POWELL, J.; BHATTACHARJEE, A. K.; KLEINBERG, M.; GOLDBLUM, S. E. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. **Journal of Biological Chemistry**; 278(6), 4112- 4120, 2003.

CROWTHER, M. A. & MARSHALL, J.C. "Continuing challenges of sepsis research". **JAMA**; 286(15): 1894-1896, 2001.

CSONTOS, C.; REZMAN, B.; FOLDI, V.; et al. Effect of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress and inflammation after severe burn. **Burns**; 38(3):428-437, 2012.

DAUPHINEE, S. M. & KARSAN, A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Laboratory Investigation**; 86(1): 9-22, 2006.

DEJAGER, L.; PINHEIRO, I.; DEJONCKHEERE, E.; LIBERT, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends Microbiol.** Artigo -"in press", 2011.

DELLINGER, R.P.; LEVY, M.M.; RHODES, A.; et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical Care Medicine**; 41:580-637, 2013.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTINI, F.; BALANSKY, R.M. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. **Carcinogenesis**; 22(7): 999-1013, 2001.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTIN, F.; CESARONE, C.F. Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. **The American Journal of Medicine**; 91:122-130, 1991.

DE VRIES N. & DE FLORA S. N-acetylcysteine. Journal of cellular biochemistry. **Supplement**; 17F: 270-7, 1993.

DEL PRADO, G. et al. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strains and effects of human serum albumin, ibuprofen, N-acetyl-L-cysteine, amoxicillin, erythromycin, and levofloxacin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**; 67, 311–318, 2010.

DEUTSCHMAN, C. S. & TRACEY, K. J. Sepsis: current dogma and new perspectives. **Immunity**; 40, 463–475, 2014.

DIMARI, J.; MEGYESI, J.; UDVARHELYI, N.; PRICE, P.; DAVIS, R.; SAFIRSTEIN, R. N acetylcysteine ameliorates ischemic renal failure. **American Journal of Physiology**; 272:292-8, 1997.

DRAGO, L., DE VECCHI, E., MATTINA, R.; ROMANO, C. L. Activity of N-acetyl-L-cysteine against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on orthopedic prosthetic materials. **International Journal of Artificial Organs**; 36, 39–46, 2013.

EDEAS, M. Strategies to target mitochondria and oxidative stress by antioxidants: key points and perspectives. **Pharmaceutical Research**; 28:2771-2779, 2011.

EGGIMANN, P.; HARBATH, S.; RICOU, B.; HUGONNET, S.; FERRIERE, K.; SUTER, P. Acute respiratory distress syndrome after bacteremic sepsis does not increase mortality. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**; 167:1210- 1214, 2003.

EL-FEKY, M. A. et al. Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. **Polish Journal of Microbiology**; 58, 261–267, 2009.

ELFERINK, J.G.R & KOSTER, B.M. N-acetylcysteine causes a transient stimulation of neutrophil migration. **Immunopharmacology**; 38.p.229-236, 1998.

EMET, S.; MEMIS, D.; PAMUKC, U. Z. The influence of N-acetyl-Lcystein infusion on cytokine levels and gastric intramucosal pH during severe sepsis. **Critical Care Medicine**; 8(4): R172-R179, 2004.

ESMON, C.T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? **Critical Care Medicine**; 32:19-22., 2004.

EUROPEAN SOCIETY OF INTENSIVE CARE MEDICINE. The problem of sepsis. **Intensive Care Medicine**; 20: 300-304, 1994.

FERRARI, G.; YAN, Y.I.; GREENE, L.A. N- acetylcysteine (D- and L- stereoisomers) prevent apoptotic death of neuronal cells. **The Journal of Neuroscience**; 15: 2857- 2866, 1995.

FINK, M.P. Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. **Critical Care Clinical**; 17(1): 219-37, 2001.

FISHBANE, S.; DURHAM, J.H.; MARZO, K.,; RUDNICK, M. N-acetylcysteine in the prevention of radiocontrast-induced nephropathy. **Journal of the American Chemical Society**; 15:251–60, 2004.

FONG, Y.; TRACEY, K.J.; MOLDAWER, L.L.; et al. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**; 170: 363-378, 1990.

FRAGA, C.M.; TOMASI, C.D.; BIFF, D.; et al. The effects of N-acetylcysteine and deferoxamine on plasma cytokine and oxidative damage parameters in critically ill patients with prolonged hypotension: a randomized controlled trial. **Journal Clinical Pharmacologic**; 52(9): 1365-1372, 2012.

GALLEY, H.F.; HOWDLE, P.D.; WALKER, B.E.; WEBSTER, N.R. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. **Free Radical Biology and Medicine**; 23(5):768-774, 1997.

GANDHI, N.R.; NUNN, P.; DHEDA, K.; SCHAAF, H.S.; ZIGNOL.M.; VAN SOOLINGEN, D.; JENSEN, P.; BAYONA, J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. **Lancet**; v. 22, p. 1830-1843, 2010.

GROENELVELD, J. et al. Regional differences in vascular reactivity in sepsis and endotoxemia. In: Vicent J, ed. Yearbook Intensive **Critical Care & Emergency Medicine**; p. 221- 232, 2001.

GUL, M.; et al. The effect of N-acetyl cysteine on serum glutathione, TNF-alpha and tissue malondialdehyde levels in the treatment of sepsis. **Ulus Travma Acil Cerrahi Derg**; p.293-297, 2011.

GÜRER, A.; OZDOGAN, M.; GOKAKIN, A.L. et al. Tissue oxidative level and remote organ injury in two-hit trauma model of sequential burn injury and peritoneal sepsis are attenuated with N-acetylcysteine treatment in rats. **Ulus Travma Acil Cerrahi Derg**; 15(1)-1-6, 2009.

HALLIWELL, B.: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**; 344:721-724, 1994.

HALLIWELL, B: Antioxidant characterization, methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**; 49:1341, 1995.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M. Free Radicals in Biology and Medicine. 3ed. Oxford: **Oxford University Press**; New York, 1999.

HAMBURGER , S.A. & McCAY, P.B. Endotoxin-induced mortality in rats is reduced by nitrones. **Circulatory Shock**; 29: 329-334, 1989.

HEIN, O.V.; OHRING, R.; SCHILLING, A.; et al. N-acetylcysteine decreases lactate signal intensities in liver tissue and improves liver function in septic shock patients, as shown by magnetic resonance spectroscopy: extended case report. **Critical Care**; 8(2): R66-R71, 2004.

HSU, B.G.; LEE, R.P.; YANG, F.L.; HARN, H.J.; CHEN, H.I. Post-treatment with N-acetylcysteine ameliorates endotoxin shock-induced organ damage in conscious rats. **Life Sciences**; 79(21), 2006.

HUBBARD, W.J.; CHOUDHRY, M.; SCHWACHA, M.G.; et al. Cecal ligation and puncture. **Circulatory Shock**; 24 Suppl 1:52-7, 2005.

HUGONNET, S.; SAX, H.; EGGIMANN, P.; et al. Nosocomial bloodstream infection and clinical sepsis. **Emerging Infectious Diseases**; 10:76–81, 2004.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DA SEPSE. [online]. Campanha Sobrevivendo a Sepsis: dados brasileiros. Disponível em: <http://www.ilas.org.br/upfiles/fckeditor/file/Relatorio%20Nacional%20fev%202013.pdf> [10 dez 2017].

JONES, P.J.H. & KUBOW, S. Lipídios, Esteróis e seus metabólitos. In: Shills, M.E.; Olson, J.A.; Shike, M.; et al. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**; 9ª edição. São Paulo: Manole, Volume 1.p.71-101 , 2003.

KAO, S.J.; WANG, D.; LIN, H.I.; CHEN H. N-acetylcysteine abrogates acute lung injury induced by endotoxin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**; 33: 33–40, 2006.

KELLY, G.S. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alternative Medicine Review**; 3:114–127, 1998.

KIEFER, P.; VOGT, J.; RADERMACHER, P. From mucolytic to antioxidant and liver protection: new aspects in the intensive care unit career of N-acetylcysteine. **Critical Care Medicine**; 28(12): 3935-3936, 2000.

KOLLEF, M.H. Time to get serious about infection prevention in the ICU. **Journal Chest**; 130:1293-1296, 2006.

KOLLS, J.K. Oxidative stress in sepsis: a redox redux. **Journal Clinical Investigation**; 116(4):860-863, 2006.

KIM, J.S.; KWON, W.Y.; SUH, G.J.; KIM, K.S.; JUNG, Y.; KIM, S.H.; LEE, S.E. Plasma glutathione reductase activity and prognosis of septic shock. **Journal of Surgical Research**; Jan; 200(1):298-307, 2016.

KUHLMANN, M. K. New Experimental Model of Acute Renal Failure and Sepsis in Rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**; v.18: 477-485, 1994.

KUMAR, S.; GUPTA, E.; KAUSHIK, S.; SRIVASTAVA, V.K.; MEHTA, S.K.; JYOTI, A.; SCAND, J. Evaluation of Oxidative Stress and Antioxidant Status: Correlation with the Severity of Sepsis. **Scandinavian Journal of Immunology**; 2018.

LAMEIRE, N. The pathophysiology of acute renal failure. **Critical Care Medicine**; 21:197-210, 2005.

LEE, J.H.; JO, Y.H.; KIM, K.; et al. Effect of N-acetylcysteine (NAC) on acute lung injury and acute kidney injury in hemorrhagic shock. **Journal Resuscitation**; 84(1):121-127, 2013.

LEEF, J.A.; WILKE, C.P.; HYBERTRONS, B.M.; et al. Postinsult treatment with N-acetylcysteine decreases IL-1 induced neutrophil influx and lung leak rats.

American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology; 265: L 501-506, 1993.

LEITE, B. et al. Combined effect of linezolid and N-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica**; 31, 655–659, 2013.

LEVY, M.M.; FINK M.P.; MARSHALL, J.C.; et al. 2001 SCCM/ESICM/ ACCP /ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**; 31(4):1250-6, 2003.

LOWRY, S.F. Cytokine mediators of immunity and inflammation. **Archives of Surgery**; 128: 1235-1241, 1993.

LU, Q.; BJORKHEM, I.; XIU, R.J.; HENRIKSSON, P. N-acetylcysteine improves microcirculatory flow during smoking: new effects of an old drug with possible benefits for smokers. **Clinical Cardiology**; 24, p.511–520, 2001.

MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V.F. da; YONEZAWA, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**; v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MANDEL, D.N. Advances in Sepsis research derived from animal models. **Int. Journal of Medical Microbiology**; 2007.

MARCHESE, A. et al. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**; 22(Suppl 2), 95–100, 2003.

MASSY, Z.A.; STENVINKEL, P.; DRUEKE, T.B. The Role Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. **Seminars in Dialysis**; v.22, n.4, p. 405-408, 2009.

MATOS, G.F.J.; VICTORINO, J.A. Critérios para o Diagnóstico de Seps, Seps Grave e Choque Séptico. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 2012.

MARTIN, G.S.; MANNINO, D.M.; EATON, S.; et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England journal of Medicine**; 348: 1546-1554, 2003.

MASEWU, A. et al. Acute kidney injury is a powerful independent predictor of mortality in critically ill patients: a multicenter prospective cohort study from Kinshasa, the Democratic Republic of Congo. **BMC Nephrology**; 17, 118, 2016.

MASINI, E.; CUZZOCREA, S.; MAZZON, E. Protective effects of M40403, a selective superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo. **British Journal of Pharmacology**; 136:905-917, 2002.

MELLO, O.R.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; MORAES, M.B.M.C.; SANTOS, C.V.R.; LORINI, V.; SILVA, V.G.; SCHERER, S.P.; BUARES, C.E.L.; LORINI, V.; DONADIO, F.V.M.; MELO S.A.D.; NUNES, B.F.; OLIVEIRA, R.J. Effect of N-acetylcysteine and Fructose-1,6-bisphosphate in the Treatment of Experimental Sepsis. **PubMed**; v. 34, p 539–550, 2011.

MENDES, L.P.M. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pelúcida* e *Portulaca pilosa*. **Revista ciências farmacêutica básica e aplicada**; v. 32, n. 1, p. 121-125. ISSN 1808-4532, 2011.

MERRELL, R.C. The abdomen as source of sepsis in critically ill patients. **Critical Care Clinical**; 11:255–72, 1995.

MEYDANI, S.N.; WU, D.; SANTOS, M.S.; et al. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. **The American Journal of Clinical Nutrition**; 62(suppl):1462S- 1476S, 1995.

MIQUEL, J.; FERRANDIZ, M.L.; DE JUAN, E.; SEVILA, I.; MARTINEZ, M. N-acetylcysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver mitochondria. **European Journal of Pharmacology**; 292: 333-335, 1995.

MOLDAWER, L.L. Biology of proinflammatory cytokines and their antagonists. **Critical Care Medicine**; 22: S3-S7, 1994.

MOLNÁR, Z.; SHEARER, E.; LOWE, D. N-acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo-controlled study. **Critical Care Medicine**; 27(6): 1100-1104, 1999.

MORENO, S. E. **Papel da IL-12, IL-18, IFN-, do PAF e da molécula de adesão ICAM-1 na fisiopatologia da sepse polimicrobiana.** Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 163f, 2005.

MULLANE, K.M.; KRAEMER, R. & SMITH, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. **Journal Pharmacology**; 74, 157-167, 1985.

NGUYEN, H.B.; RIVERS, E.P.; KNOBLICH, B.P.; et al. Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**; 32:1637-42, 2004.

NOLIN, T.D.; MCMENAMIN, M. E.; HIMMELFARB, J. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress. **Journal of Chromatography**; v.852, n.1-2, p.554-561, 2007.

NUNES F. B., GRAZIOTTIN C. M., ALVES FILHO J. C. F., LUNARDELLI A., PIRES M. G. S., WÄCHTER P. H., OLIVEIRA J. R. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. **Pharmacological Research**; 47 (1): 35-41, 2003.

OLOFSSON, A. C., HERMANSSON, M.; ELWING, H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**; 69, 4814–4822, 2003.

ORTOLANI, O.; CONTI, A.; DE GAUDIO, A.R.; MORALDI, E.; CANTINI, Q.; NOVELLI, G. The effect of glutathione and N acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. **American journal of Respiratory and Critical Care Medicine**; 161:1907-11, 2000.

OPAL, S.M. & DEPALO, V.A. Anti-inflammatory cytokines. **Journal of Chest Diseases**; 117(4): 1162–1172, 2000.

OZATA, M.; MERGEN, M.; OKTENLI, C.; et al.: Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clinical Biochemistry**; 35:627-631, 2002.

PAES, N. A.. A mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias na população idosa brasileira. **Revista Panamericana de Salud Pública**; 4, 233–41, 2004.

PARRILO, J.E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **Journal of Medicinal Chemistry**; 328: 1471-1477, 1993.

PEAKE, S.L.; MORAN, J.L.; LEPPARD, P.I. N-acetyl-L-cysteine depresses cardiac performance in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**; 24(8):1302-1310, 1996.

PEREIRA JÚNIOR, G.AMARSON, F.; ABEID, M; OSTINI, F.; M. SOUSA, S.; BASILE-FILHO. A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Revista Medicina Ribeirão Preto**; V.31: 349-362, 1998.

PEREZ, R.S.; ZUURMOND, W.W., BEZEMER, P.D.; KUIK, D.J., VAN LOENEN, A.C.; DE LANGE, J.J.; ZUIDHOF, A.J. The treatment of complex regional

pain syndrome type I with free radical scavengers: a randomized controlled study. **Pain Journal**; 102: 297-307, 2003.

PEREZ-GIRALDO, C. et al. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**; 39, 643–646, 1997.

PINHO, R.A.; SILVEIRA, P.C.; SILVA, L.A.; STRECK, E.L.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. N-acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. **Environmental Research**; 99(3): 355-60, 2005.

PINSKY, M.R. Antioxidant therapy for severe sepsis: promise and perspective. **Critical Care Medicine**; 31(11):2697-2698, 2003.

POBER, J.S.; BEVILACQUA, M.P.; MENDRICK, D.L.; LAPIERRE, L.A.; FIER, W.; GIMBRONE, M.A. Two distinct monokines, interleukin-1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. **Journal of Immunology**; 136: 1680-87, 1986.

PRADIPTA, I.S.; SODIK, D.C.; LESTARI, K.; et al. Antibiotic resistance in sepsis patients: evaluation and recommendation of antibiotic use. **North American journal of medical sciences**; v. 5(6), p. 344-352, 2013.

RÉA NETO, A. Fisiopatologia e manifestações clínicas da sepse. **Clínica Brasileira de Medicina Intensiva**; v.1: 1-9, 1996.

REED, D.J.; FARRISS, M.W. Glutathione depletion and susceptibility. **Pharmacological Reviews**; 36: 255-335, 1984.

REMICK, D.G. Cytokine therapeutics for the treatment of sepsis: Why has nothing worked? **Current Pharmaceutical Design**; 9:75–82, 2003.

REMICK, D.G.; BOLGOS, G.E.; SIDDIQUI J. Inflammatory status in sepsis alters efficacy of interleukin-18 binding protein therapy. **Critical Care Medicine**; 31:2096-2101, 2003.

RIEDEMANN, N.C.; GUA, R.F.; WARD P.A. The enigma of sepsis. J Clin Invest, 112,460-7,2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. **Nature; Medicine**, 9,517-24, 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. **Critical Care Medicine**; 32: 342-349, 2004.

RIVERS, E.; NGUYEN, B.; HAVSTAD, S.; et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. **Journal of Medicine**; 345(19):1368-77, 2001.

RIVERS, E.P.; MCINTYRE, L.; MORRO, D.C.; et al. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. **Canadian Medical Association Journal**; 173(9):1054-65, 2005.

RIVERS, E.P.; COBA, V.; WHITMILL, M. Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock: a contemporary review of the literature. **Current Opinion in Anaesthesiology**; 21(2):128-40, 2008.

ROBSON, W.; NEWELL, J. Assessing, treating, and managing patients with sepsis. **Nursing Standard**; 19(50):56-64, 2005.

RUSSELL, J.A. Management of sepsis. **Journal of Medicine**; 355(16):1699–1713, 2006.

SALOMAO, R.; MARTINS, P.S.; BRUNIALTI, M.K.; et al. TLR signaling pathway in patients with sepsis. **Shock**; 30(Suppl 1):73-7, 2011.

SALOMÃO, R.; DIAMENT, D.; RIGATTO, O.; et al. **Diretrizes para o tratamento da sepse grave/choque séptico: abordagem do agente infecciosos- controle do foco infeccioso e tratamento antimicrobiano**. V.23, n.2, p. 145-157, 2011.

SALVEMINI, D.; RILEY, D.P.; LENNON, P.J. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. **British Journal of Pharmacology**; 127:685-692, 1999.

SAMUNI, Y., GOLDSTEIN, S., DEAN, O. M.; BERK, M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica et Biophysica**; Acta 1830, 4117–4129, 2013.

SANTOS, M. C. Sepse. Manual de rotinas da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Manaus: 2003. Disponível em: <www.fmt.am.gov.br/manual/sepse.htm>. Acesso em: 23 dez. 2017, às 09h.

SAPATEN, H. N-acetylcysteine in clinical sepsis: a difficult marriage. **Critical Care**; 8: 229-230, 2004.

SCHMIDT, W.; WALTHER, A.; GEBHARD, M.M.; MARTIN, E.; SCHMIDT, H. Influence of N-acetylcysteine treatment on endotoxin-induced microcirculatory disturbances. **Intensive Care Medicine**; 24(9): 967-972, 1998.

SHANKAR-HARI, M.; PHILLIPS, G.S.; LEVY, M.L.; SEYMOUR, C.W.; LIU, V.X.; DEUTSCHMAN, C.S.; ANGUS, D.C.; RUBENFELD, G.D.; SINGER, M. Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**; 315(8):775-87, 2016.

SENOGLU, N., YUZBASIOGLU, M.F.; ARAL, M.; et al. Protective effects of N-acetylcysteine and beta-glucan pretreatment on oxidative stress in cecal ligation and puncture model of sepsis. **Journal of Investigative Surgery**; 21(5):237-243, 2008.

SEVIER, C. S. & KAISER, C. A. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**; 3, 836–847, 2002.

SEYMOUR, C.W.; LIU, V.X.; IWASHYNA, T.J.; BRUNKHORST, F.M.; REA, T.D.; SCHERAG, A. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8):762-74. Erratum in: **JAMA**; 315(20):2237, 2016.

SCHORR, C.A.; DELLINGER, R.P. The Surviving Sepsis Campaign: past, present and future. **Trends Molecular Medicine**; Apr; 20(4): 192-4, 2014.

SENOGLU, N.; YUZBASIOGLU, M.F.; ARAL, M.; et al. Protective effects of N-acetylcysteine and beta-glucan pretreatment on oxidative stress in cecal ligation and puncture model of sepsis. **Journal of Investigative Surgery**; 21(5):237-243, 2008.

SEVIER, C. S. & KAISER, C. A. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**; 3, 836–847, 2002.

STECKERT, A.V.; et al. Sepsis in the central nervous system and antioxidants strategies with N-acetylcysteine, vitamins and statins. **Current Neurovascular Research**; p.83-90, 2014.

SEVRANSKY, J. E. et al. Pulmonary vs nonpulmonary sepsis and mortality in acute lung injury. **Chest**; 134, 534–538, 2008.

SHAIK, I.H.; MEHVAR, R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**; v. 385, n. 1, p.105-13, 2006.

SIAMI, S.; ANNANE, D.; SHARSHAR, T. The encephalopathy in sepsis. **Critical Care Clinical**; (1): 67-82. viii ,2008.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**; 91(3C): 31-38, 1991.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**; v. 215, n. 2, p. 213-19, 1993.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C.S.; SEYMOUR, C.W.; SHANKAR-HARI, M.; ANNANE, D.; BAUER, M. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**; 315(8): 801-10, 2016.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CALIXTO-LIMA, L.; et al. Sepsis: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**; v. 23, n. 2, p. 207-216, 2011.

SILVA, F.P.; VELASCO, I.T. Diagnóstico médico na sepse. **Critical Care Medicine**; p. n. 4, 2007.

SILVA, E.; PEDRO, M.D.E.A.; SOGAYAR, A.C.; et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**; 8:R251-60, 2014.

SOGAYAR, A.M.; MACHADO F, R.; REA-NETO, A.; et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**; 26(5):425-34, 2008.

SOUZA, D.G.; CASSALI, G.D.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M. Effects of inhibition of PDE4 and TNFalpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **British Journal of Pharmacology**; 134, 985-994, 2001.

SPIES, C.; REINHART, K.; WITT, I.; MEIER-HELLMANN, A.; HANNEMANN, L, DONALD, L.; BREDLE, P.D.; SCHAFFARTZIK, W. Influence of N-acetylcysteine on indirect indicators of tissue oxygenation in septic shock patients: results from a prospective, randomized, double-blind study. **Critical Care Medicine**; 22:1738–1746, 1994.

SPAPEN, H.; ZHANG, H.; DEMANET, C.; VLEMINCKX, W.; VINCENT, J.L.; HUYPGHENS, L. Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock? **Chest**; 113(6): 1616-1624, 1998.

SZAKMANY, T.; HAUSER, B.; RADERMACHER, P. N-acetylcysteine for sepsis and systemic inflammatory response in adults. Cochrane Database. **Systematic Reviews**; (9), 2012.

TACCONELLI, E.; DE ANGELIS, G.; CATALDO, POZZI, E.; CAUDA, R. Does antibiotic exposure increase the risk of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**; v. 61, p. 26- 28, 2007.

TAYLOR, D.E.; PIANTADOSI, C.A.: Oxidative Metabolism in Sepsis and Sepsis Syndrome. **Critical Care**; 10(3): 122-135, 1995.

TEPEL, M.; VAN DER GIE,T M.; SCHWARZFELD, C.; LAUFER U.; LIERMANN D.; ZIDEK, W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. **New England Journal of Medicine**; 20; 343(3): 180-4, 2000.

TEPEL, M. "Acetylcysteine for the prevention of radiocontrast -induced nephropathy." **Minerva Cardioangiol**; 51(5): 525-530, 2003.

THIJS, L.G.; HACK, C.E. Time course of cytokine levels in sepsis. **Intensive Care Medicine**; 21: S258-S263, 1995.

THOMAS, J.A. Estresse Oxidativo e Defesa contra antioxidantes. In: Shills, M.E.; Olson, J.A.; Shike, M.; et al, editores. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**; 9º edição. São Paulo: Manole, Volume 1.p.801-812, 2003.

TODAR, K. Immune defense against bacterial pathogens: innate immunity. **Todar's online textbook of bacteriology**, 2008.

TUMUR, Z.; SHIMIZU, H.; ENOMOTO, A.; MIYAZAKI, H.; NIWA, T. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation. **American Journal Nephrology**; v.31, n. 5, p. 435-41, 2010.

VAJDOVICH, P. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**; 38:31–123, 2008.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZURA, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**; 39:44-84, 2007.

VASSILEV, D.; HAUSER, B.; BRACHT, H.; et al. Systemic, pulmonary, and hepatosplanchnic effects of N-acetylcysteine during long-term porcine endotoxemia. **Critical Care Medicine**; 32(2):525-532, 2004.

VINCENTE, J.L.; MARTINEZ, E.O.; SILVA, E. Evolving concepts in sepsis definitions. **Critical Care Nursing Clinics of North America**; 23(1): 29-39, 2011.

VINCENT, J.L. Clinical sepsis and septic shock--definition, diagnosis and management principles. **Langenbecks Arch Surgery**; 393(6):817-24, 2008.

VICTOR, V.M.; GUAYERBAS, N.; GARROTE, D.; DEL RI'Ó, M.; DE LA FUENTE, M. Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. **Biofactors**; 10 (4):347-357, 1999.

VICTOR, V.M.; ROCHA, M.; DE LA FUENTE, M. N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. **Free Radical Research**; 37(9):919-929, 2003.

VOGELAERS, D.; DE BELS, D.; FORÊT, F. et al. Patterns of antimicrobial therapy in severe nosocomial infections: empiric choices, proportion of appropriate

therapy, and adaptation rates a multicenter, observational survey in critically ill patients. **In intern jour of antimicrobial agents**; v.35 (4), p. 375-381, 2010.

VULCANO, M.; MEISS, R.P.; ISTURIZ, M.A. Deferoxamine reduces tissue injury and lethality in LPS-treated mice. **International Journal of Immunopharmacology**; 22:635-644, 2000.

XIONG, Y.; PETERSON, P.L.; LEE, C.P. Effect of N-acetylcysteine on mitochondrial function following traumatic brain injury in rats. **Journal of Neurotrauma**;16:1067-1082, 1999.

WAN, F.J.; TUNG, C.S.; SHIAH, I.S.; LIN, H.C. Effects of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron and N-acetylcysteine on hydroxyl radical formation and dopamine depletion in the rat striatum produced by d-amphetamine. **European Neuropsychopharmacology**; 16: 147-153, 2006.

WHANG, H.W.; et al. N-acetylcysteine administration is associated with reduced activation of NF-kB and preserves lung dendritic cells function in a zymosan-induced generalized inflammation model. **Journal of Clinical Immunology**; p.649-660, 2013.

WICHTERMAN, K.A.; BAUE, A.E.; CHAUDRY, I.H. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**; 29: 189–201, 1980.

WIDMEIER, K. & WESLEY, K. Infection detection: identifying and understanding sepsis in the prehospital setting, part 1 of 2. **JEMS**; 39:34–7, 2014.

WILSON, J.X. Evaluation of vitamin C for adjuvant sepsis therapy. **Antioxid Redox Signal**; v. 19, p. 2129-2140, 2013.

YAMADA, M., ISHIHARA, K., OGAWA, T.; SAKURAI, K. The inhibition of infection by wound pathogens on scaffold in tissue-forming process using N-acetyl cysteine. **Biomaterials**; 32, 8474–8485, 2011.

YILMAZ, H.; SAHIN, S.; SAYAR, N.; TANGUREK, B.; YILMAZ, M.; NURKALEMZ; et al. Effects of folic acid and N-acetylcysteine on plasmahomocysteine levels and endothelial function in patients with coronary artery disease. **Acta Cardiologica**; 62:579–85, 2007.

ZHAO, T. & LIU, Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Microbiology**; 10, 140, 2010.

ZAPPAROLI, A.; COLLETO, C.A.; GONTIJO, J.A.R. Evaluation of renal function in septic spontaneously hypertensive rat. **Advanced Studies in Biology**; 3(1): 01 – 11, 2011.

ZIMENT, I. “Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic”. **Biomedicine & Pharmacotherapy**; 42(8): 513-519, 1998.