RAFAEL IZAR DOMINGUES DA COSTA

Efeitos da N-acetilcisteína na resposta inflamatória e na translocação bacteriana em modelo de obstrução e isquemia intestinal em ratos.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica

Orientadora: Profa. Dra. Edna Frasson de Souza Montero

São Paulo

2017

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. Guia de apresentação e dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Cordeiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2012

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com List Journals Indexed in Index Medicus.

DEDICATÓRIA

Dedico cada letra escrita nestes papéis a minha esposa, mulher da minha vida, Flávia Cury Rezende, por ser o alicerce que sustenta quem eu sou, por permitir que eu dedicasse grande parte do nosso tempo à pesquisa, e por nunca me deixar desistir. Cada lágrima e cada gota de suor que perdi foram amparados por ela, e sua ausência significaria a minha ausência.

Ao meu filho Lucas, que me ensinou que tudo de bom que eu posso ser, é pouco perto do quanto eu posso ser melhor. Por me ensinar que a palavra amor nunca terá apenas um significado ou um tom. Por ser a luz dos meus dias.

Ao meu pai, Gabriel Domingues da Costa Neto, que mais do que medicina e cirurgia, me ensinou a ser homem, humano. Seu caráter e sua bondade até hoje me surpreendem. Sua dedicação à profissão, e o amor com qual a exerce, me contagia e me motiva.

A minha mãe, Valéria de Fátima Izar Domingues da Costa, porto seguro quando eu não sabia para onde correr. Meu maior exemplo de superação, de dona de casa e mãe de três filhos, a advogada, concursada e mestra. Sua inteligência e dedicação fazem eu querer sempre mais.

Aos meus irmãos Gabriel e Marcel Izar Domingues da Costa, ponto e contraponto. Pessoas completamente diferentes, mas que juntos formamos um tripé, que sustenta firme uma família com muito amor.

A Deus, por permitir que eu possa acordar todos os dias e exercer a profissão que escolhi, cercado de pessoas que amo, e por nunca me deixar sentir desamparado.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Edna Frasson de Souza Montero, principalmente pela paciência com minha inexperiência, pela sua bondade e espiritualidade como pessoa e pela dedicação à docência. Seus conhecimentos e ensinamentos me fizeram uma pessoa melhor.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Massazo Utiyama, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Geral e do Trauma, FMUSP, por me ter permitido realizar a pós-graduação pela divisão de Clínica Cirúrgica III, além dos muitos ensinamentos técnicos e de vida, implícitos em suas frases que algumas vezes demoravam, mas sempre faziam sentido.

À Dra. Marcia Kiyomi Koike, por ter colaborado ativamente em cada etapa, dedicado seu tempo e seu conhecimento em me auxiliar, por muitas vezes me fazendo aprender com seus enigmas.

Ao colega Dr. Roberto Rasslan, por ter me ensinado a prática de laboratório, e ter me acompanhado e apoiado até o final desta jornada, além de manter-se um amigo pessoal e incentivador.

À Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn, pela colaboração nos estudos da atividade inflamatória.

Aos colegas Fabiana T. Franca, Vinicius C. da Fonseca, Matheus A. Buzzo e Guilherme T. Kappaz, por entenderem os momentos difíceis e permitir que eu chegasse ao êxito.

Aos meus sogros e cunhados, por sempre acrescentarem idéias, incentivo e muito apoio.

Aos membros do LIM-62, Mario Matsuo Itinoshe, Ana Maria Cattani Heimbecker, Elisabeth Hiroe Minami, Luci Yukiko Takasaka e Natalie Chaves Ferreira, pelo apoio incondicional e suporte, principalmente ao Marco de Luna, pelas horas e horas de conversa e companhia, além do trabalho árduo.

Aos alunos Victor Hugo Iagnuma Maria e Marina Ruella Vizaco, pela ajuda de indispensável valia na execução dos experimentos.

A todos que, mesmo indiretamente, proporcionaram as condições para que uma idéia se tornasse concreta.

“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”

Leonardo da Vinci

“Há sempre a escolha entre voltar atrás para a segurança ou seguir em frente para o crescimento. O crescimento deve ser escolhido uma, duas, três e infinitas vezes; o medo deve ser superado uma, duas, três e infinitas vezes.”

Abraham Maslow

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	7
MÉTODOS	8
<u>Constituição dos grupos</u>	8
<u>Procedimento anestésico e analgesia</u>	9
<u>Modelo experimental de obstrução e isquemia intestinal</u>	9
<u>Eutanásia e descarte de animais</u>	11
<u>Gasometria e lactato arteriais, leucograma e granulócitos</u>	11
<u>IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ em rins e pulmões</u>	11
<u>Ensaio microbiológico em linfonodos mesentéricos e outros tecidos</u>	12
<u>Avaliação histológica de rins e de pulmões</u>	12
<u>Análise estatística</u>	13
RESULTADOS	14
<u>Gasometria e lactato arteriais, leucograma e granulócitos</u>	14
<u>IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ nos rins</u>	15
<u>IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ nos pulmões</u>	16
<u>Ensaio microbiológico em linfonodos mesentéricos e outros tecidos</u>	18
<u>Avaliação histológica de rins</u>	19
<u>Avaliação histológica de pulmões</u>	20
DISCUSSÃO	21
CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia mostrando íleo terminal, ceco e o suprimento vascular do mesentério (à esquerda) e Fotografia mostrando ligadura dos vasos do mesentério e da extremidade do íleo (seta azul, à direita).	
Figura 2. Fotografias mostrando segmento intestinal isquêmico, com alça distendida a montante (seta azul, à esquerda), mostrando segmento comprometido ressecado (seta azul, ao centro) e mostrando anastomose de intestino Delgado (seta azul à direita).	
Figura 3 - Dosagem da citocina IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e INF- γ no tecido renal no momento da eutanásia dos grupos submetidos a tratamento comparados ao grupo sem terapêutica (OI).	
Figura 4 - Dosagem da citocina IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e INF- γ no tecido pulmonar no momento da eutanásia dos grupos submetidos a tratamento comparados ao grupo sem terapêutica (OI)	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de gasometria arterial coletadas 6 horas após obstrução intestinal e isquemia (Momento 1) e 24 horas após enterectomia e reanimação (Momento 2).	
Tabela 2 - Valores de leucócitos e granulócitos, expressos em mediana e intervalos inter-quartis, coletados antes da realização da primeira cirurgia (Inicial), 6 horas após obstrução e isquemia intestinal (Momento 1) e 24 horas após enterectomia e reanimação (Momento 2).	
Tabela 3 - Contagem de UFC/g nos diferentes tecidos coletados no momento da eutanásia.	
Tabela4 - Número absoluto de animais com culturas positivas em linfonodo e outro tecido.	
Tabela 5 - Grau das alterações histológicas renais no momento da eutanásia.	
Tabela 6 - Grau das alterações histológicas pulmonares no momento da eutanásia	

LISTA DE ABREVIATURAS

BE	Excesso de Base
COX-2	Ciclooxigenase Tipo 2
ERK-1	Quinase regulada por sinal extracelular tipo 1
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FMUSP	Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo
I- κ B	Proteína Inibidora de kappaB
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LIM-62	Laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica
LNM	Linfonodos mesenteriais
NAC	N-Acetilcisteína
NF- κ B	Fator Nuclear kappaB
NO	Óxido Nítrico
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PBST	Solução salina fosfato tamponada com Tween 20
RL	Ringer Lactato
SH	Solução Salina Hipertônica
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TLR	Receptores Tipo Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônias por Grama

INTRODUÇÃO

A obstrução intestinal mecânica representa uma condição de urgência, necessitando diagnóstico precoce e terapêutica adequada, em virtude do seu elevado grau de morbidade e de mortalidade. Nos EUA, ocorrem 30.000 mortes por ano em decorrência de abdome agudo obstrutivo[1]. No Brasil, segundo pesquisa no DataSUS[2], ocorreram cerca de 4.000 óbitos em 2013 por abdome agudo, apesar de considerar estes registros como subestimados.

De todas internações hospitalares por abdome agudo, cerca de 20% são em virtude de causas obstrutivas[3], podendo acometer tanto o intestino delgado quanto os colons. As causas mais comuns são diversos fatores extrínsecos, como aderências, hérnias, carcinomatose, volvo e endometriose, ou por fatores intrínsecos, como tumores, estenoses, intussuscepção, doenças inflamatórias, entre outros[4].

As aderências pós-operatórias (56%) seguidas pelas hérnias (20%) representam as principais causas de obstrução do intestino delgado. Nos colons, as neoplasias constituem 60% e as torções (Volvos) 20% das causas, ambas podendo apresentar-se em caráter agudo e com oclusão luminal completa ou parcial[4].

Uma vez instalada a oclusão, o aporte sanguíneo do intestino pode ser afetado, tanto por pinçamento ou torção dos vasos, como pelo aumento da pressão intra-luminal e edema, comprimindo os vasos da submucosa e acometendo o retorno venoso, causando assim um quadro de congestão[5]. Quando o suprimento sanguíneo não foi comprometido, a obstrução é considerada simples, com menor risco de complicações, porém, quando há isquemia associada o risco de translocação bacteriana e perfuração aumenta, chegando a uma incidência de 15% de necrose intestinal[6].

A alça intestinal proximal ao segmento obstruído começa a dilatar-se, iniciando um regime de aumento na secreção de fluídos pela mucosa, assim como importante alteração na motilidade, constituindo assim as principais alterações fisiopatológicas[7].

O acúmulo de líquidos associado a sua estase favorece a proliferação bacteriana, com consequente fermentação e aumento do volume de gases, resultando inicialmente em aumento do aporte arterial, ativação de neutrófilos e macrófagos, com liberação de citocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio[8].

Em estudo experimental, Nellgard e Cassuto [8] demonstraram que animais com obstrução intestinal apresentam maior secreção de fluídos para o lúmen, enquanto animais sem obstrução apresentam maior absorção, sendo este um fator determinante para desencadear processo inflamatório local e perda maciça de volume, podendo desencadear a resposta inflamatória sistêmica.

A presença de lesão do epitélio intestinal com liberação de mediadores inflamatórios sistêmicos e quebra da barreira mucosa com translocação comprovada de *Escherichia coli* foi demonstrada por Generoso e cols [9] em modelo de obstrução intestinal em ratos.

O trato gastro-intestinal é colonizado por mais de 1000 espécies de bactérias, divididas em anaeróbios obrigatórios (95%) como o *Clostridium sp* e *Bacteroides sp*, entre outros, e anaeróbios facultativos (5%) representados principalmente por *Escherichia coli* e *Klebsiella sp*[10].

Sua presença no lúmen tem papel importante na diferenciação do epitélio, produção de enzimas que ajudam a digestão e principalmente atuando em uma resposta inflamatória balanceada, que modula processos imunológicos e impede a proliferação e instalação de bactérias patogênicas[11].

A translocação bacteriana é estabelecida quando bactérias presentes no intestino ou seus metabólitos atingem a corrente sanguínea, sendo considerada um importante desencadeante para sepse, dependendo de, pelo menos, um de três fatores: 1) alterações na flora intestinal normal, com diminuição dos microorganismos não patógenos; 2) quebra da barreira mucosa; 3) deficiência imunológica do paciente[12].

Mesmo em condições de normalidade, a translocação bacteriana para linfonodos ocorreu em 15% de uma série de pacientes submetidos a cirurgia abdominal. Na maioria dos casos, não houve repercussões infecciosas, porém, quando analisado o grupo de pacientes que apresentavam cultura positiva, o risco de sepse foi de 45% contra 19% versus aqueles com cultura negativa[13].

A mucosa intestinal constitui a primeira linha de defesa, sendo repleta de mucina e peptídeos anti-microbianos. As bactérias que vencem essa barreira são sinalizadas por receptores do tipo *Toll-like* e fagocitadas por macrófagos da submucosa[11]. Em situações de isquemia e reperfusão, a liberação de radicais livres

e fatores pró-inflamatórios altera a microcirculação, aumentando a permeabilidade da mucosa[14].

A isquemia promove acidose da mucosa enteral, levando a alteração de sua citoarquitetura e facilitando a passagem de bactérias para o sistema linfático, onde atingem os linfonodos por duas vias: a transcelular, que é a passagem através dos enterócitos, utilizando canais e bombas de membrana específicas; e, a paracelular, com passagem pela junção dos enterócitos, comprometida em processos inflamatórios e estímulos de microorganismos[15, 16].

Após ultrapassarem a barreira da submucosa, as bactérias ou suas toxinas atingem a circulação sistêmica através da circulação venosa portal ou pelos vasos linfáticos mesenteriais, desencadeando resposta inflamatória [17].

O conceito de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) foi definido em 1991, após consenso do *American College of Chest Physicians* e *Society of Critical Care Medicine*, com o objetivo de padronizar as definições de sepse, sepse grave, choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos[18], sendo atualizado em 2016, excluindo-se a definição de sepse grave[19]. A SIRS constitui a resposta clínica do organismo a um insulto inespecífico, seja ele puramente inflamatório ou infeccioso, sendo caracterizada pela presença de pelo menos dois de quatro critérios pré-estabelecidos[18].

O organismo quando insultado por um agente infeccioso, ou na vigência de um processo inflamatório como queimadura, trauma, pancreatite, doenças auto-imunes e procedimentos cirúrgicos, promove liberação de citocinas pró-inflamatórias diversas, que possuem efeito direto na microcirculação, sendo responsáveis por parte importante do dano tecidual, mesmo quando o estímulo ou agente que iniciou o quadro é contido[20].

Após o insulto inicial, o objetivo do organismo é alcançar a homeostasia, reduzindo assim a produção de citocinas pró-inflamatórias e iniciando a produção de antagonistas. Porém, quando o fator que gerou a agressão não é interrompido, os mediadores liberados para controle do quadro assumem papel maléfico, ativando cascatas inflamatórias e o sistema retículo-endotelial, lesando a microcirculação e conduzindo a disfunção de órgãos[20].

Um dos primeiros mediadores pró-inflamatórios descrito na década de 70 foi o fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- α), identificado como mediador do choque

endotóxico, com relação direta com a transcrição de fatores sinalizadores da cascata inflamatória, como interleucinas (IL), óxido nítrico, fator de ativação plaquetária, sistema complemento, entre outros[21, 22].

A expressão do TNF- α depende da ativação de receptores tipo *Toll like*, que sinalizam a degradação da proteína inibidora de kappaB (I- κ B), ativando assim o Fator Nuclear kappaB (NF- κ B), que adentra o núcleo celular e sinaliza a própria síntese e a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias[23].

O TNF- α também estimula a liberação de outras citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-1 β e Interferon-gama (IFN- γ). A IL-1 β é responsável por febre, sonolência e hipotensão[24] e a IL-6 aumenta as proteínas de fase aguda hepática e aumenta a reabsorção óssea[25]. Desencadeada a resposta sistêmica, a integração entre leucócitos e endotélio resulta em aumento da permeabilidade, com consequente incremento na atividade destas células no tecido inflamado e edema local, tendo como consequência a liberação de metabólitos do ácido aracdônico, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio.[26].

Os metabólitos do ácido aracdônico resultantes das vias da lipoxigenase e ciclooxigenase possuem importante efeito na circulação, causando diminuição da resistência vascular com consequente hipotensão e choque[26]. A hipotensão e choque presentes nos quadros de SIRS são decorrentes também da produção exacerbada de óxido nítrico (NO) a nível vascular causando vasodilatação refratária a vasopressores e a nível de miocárdio causando disfunção ventricular[27].

A lesão endotelial também possui papel importante na relação entre inflamação e coagulação. A expressão aumentada de TNF- α sinaliza a produção de trombina, que promove coagulação e tem ação como mediador pró-inflamatório. A ação do TNF- α e IL-1 β inibe a fibrinólise, gerando trombose da microcirculação e subsequente disfunção orgânica[28].

Uma vez desencadeada a SIRS, o organismo inicia vias de sinalização para controlá-la, sintetizando antagonistas de receptores de TNF- α e IL-1 β , citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 que diminuem a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8. O balanço entre mediadores pró e anti-inflamatórios determina o prognóstico do paciente acometido. A mortalidade estimada é de 7% na ausência de infecção e de cerca de 46% no choque séptico[29].

Várias estratégias foram estudadas e testadas na tentativa de controlar os danos orgânicos na SIRS, como controlar o fator que desencadeou a síndrome, restabelecer a homeostase e minimizar as consequências[18]. Interromper o fator que desencadeou a síndrome, apesar de fundamental pode ser de extrema dificuldade devido a diversidade dos insultos e seu grau de irreversibilidade. Com o dano à microcirculação com consequente vasodilatação, o restabelecimento da homeostase depende invariavelmente da restituição do volume intravascular e resistência vascular periférica[18]. A reposição volêmica com uso de soluções cristalóides, como o *Ringer* lactato, requer a infusão de grandes volumes devido seu extravasamento para o interstício, o que aumenta os danos à microcirculação e ao processo inflamatório[30].

Devido aos maus resultados com o emprego dos cristalóides, na década de 80 outras opções de soluções foram testadas, como a solução salina hipertônica (SH), com resultados promissores, como no estudo de Velasco e colaboradores[31] que demonstraram restabelecimento dos parâmetros hemodinâmicos com uso de SH de NaCl 7,5% em quantidade relativa a 10% do volume sangrado em modelo experimental de choque hemorrágico severo (4ml/Kg x 40 ml/Kg).

Estudos subsequentes demonstraram os benefícios da SH, como a necessidade de infusão de volumes menores para atingir a homeostasia em modelo de sepse[32] assim como expressão de fatores de transcrição presentes na resposta inflamatória, como o NF-κB e a quinase regulada por sinal extracelular tipo 1 (ERK-1), que se encontram diminuídos quando SH foi empregada[33].

A utilização da SH em obstrução intestinal e isquemia em ratos, com ressecção do segmento acometido após 24 horas demonstrou presença de translocação bacteriana em 86% dos linfonodos mesenteriais, assim como 57% de hemocultura positiva. A SH de NaCl a 7,5% levou à menor expressão de moléculas de adesão, assim como menor translocação bacteriana e mortalidade[34, 35].

Embora estudos experimentais tenham demonstrado benefícios da SH, ainda há controvérsias nos estudos em humanos. Por um lado, dois ensaios clínicos realizados em pacientes traumatizados [36, 37] que receberam infusão de SH no pré-hospitalar não revelaram significância estatística em relação a sobrevida e mortalidade, diminuindo interesse em sua utilização. Por outro lado, Haren e colaboradores[38] infundiram SH em pacientes com choque séptico e observaram melhora do tônus vascular e contratilidade do miocárdio.

No modelo experimental de obstrução intestinal e isquemia, Rasslan e cols [39] associaram a Pentoxifilina à SH e demonstraram redução na atividade inflamatória e estresse oxidativo. Assim como a Pentoxifilina, a N-acetilcisteína (NAC) tem papel na redução das espécies reativas de oxigênio, sendo uma derivação do aminoácido cisteína, capaz de restabelecer os níveis intracelulares de glutathione, com seu emprego bem estabelecido na intoxicação por acetaminofeno (paracetamol) e na doença pulmonar obstrutiva crônica[40].

A NAC é capaz de modular a expressão de genes que sintetizam citocinas pró-inflamatórias, suprimir o NF- κ B responsável pela ativação dessas citocinas, além de regular a transcrição de ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), enzima produtora de prostaglandinas e outros fatores que atuam na SIRS[41].

Em estudo recente, Wang[42] e colaboradores demonstraram após indução de SIRS em ratos que a aplicação precoce e repetida de NAC durante 36 horas reduziu a atividade de NF- κ B e protegeu contra apoptose das células dendríticas pulmonares, diminuindo disfunção e lesões pulmonares, com consequente redução de mortalidade.

Da mesma forma, Gül[43] e colaboradores comprovaram diminuição dos níveis de TNF- α e aumento na concentração eritrocitária de glutathione. Csontos[44, 45] e colaboradores avaliaram a NAC em pacientes vítimas de queimadura superior a 20% da superfície corpórea, demonstrando seus benefícios pela diminuição da necessidade de drogas vasopressoras, dos níveis de interleucinas e da expressão de marcadores de superfície de leucócitos. Steckert[46] e colaboradores descreveram revisão da associação de NAC com estatinas e vitaminas no tratamento de pacientes com sepse do sistema nervoso, com resultados positivos na diminuição do estresse oxidativo.

OBJETIVO

Avaliar o efeito da N-acetilcisteína associada ao Ringer lactato ou à solução salina hipertônica na resposta inflamatória, histologia e translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução e isquemia intestinal.

MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada seguindo os princípios internacionais da experimentação em animais[47] e a Lei 11.794/ 2008 para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório, sendo iniciada após aprovação pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Cirurgia e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, número 429/13.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica, LIM-62, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Foram utilizados ratos machos, linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com peso aproximado de 250 a 300 g. Os animais foram mantidos no biotério nas fases pré e pós-experimental, com livre acesso à ração e água, em ambiente controlado para temperatura, umidade e exposição à luz artificial, com ciclos de claro e escuro de 12 horas.

O cálculo do tamanho da amostra baseou-se na fórmula que permite o cálculo do tamanho da amostra, além do poder estatístico do estudo: $\text{Diferença Padrão} = \text{Diferença Estimada} / \text{Desvio Padrão}$. Assim, com os dados de IL-6 do estudo prévio [39] feito no laboratório, obtém-se $1,43/0,63 = 2,27$; este valor foi colocado no nomograma[48], obtendo-se o tamanho da amostra de acordo com o poder estatístico do estudo(90%). Para este cálculo, seriam 10 animais por grupo. Portanto, decidiu-se por alocar 10 animais por grupo e 5 animais que foram submetidos a anestesia e sacrificados para coleta de amostras, para servirem como grupo Referência.

Constituição dos grupos

Foram constituídos quatro grupos experimentais, com 10 animais em cada, além do grupo de referência:

1. OI – Submetidos a obstrução e isquemia intestinal e enterectomia com anastomose intestinal, sem reanimação volêmica;
2. RL – Submetidos a obstrução e isquemia intestinal, reanimação volêmica com Ringer lactato (32ml/kg, i.v., em 10 minutos) e enterectomia com anastomose intestinal;

3. RLNAC – Submetidos a obstrução e isquemia intestinal, reanimação volêmica com Ringer lactato associado a NAC (32ml/kg + 150 mg/kg i.v. em 10 minutos) e enterectomia com anastomose intestinal;

4. SHNAC – Submetidos a obstrução e isquemia intestinal, reanimação volêmica com solução salina hipertônica a 7,5% associado com NAC (4ml/kg + 150 mg/kg i.v., em 10 minutos) e enterectomia com anastomose intestinal.

Grupo Referência (n=5): Animais anestesiados, submetidos a coleta de materiais para cultura e histologia e sacrificados por exsanguinação.

Procedimento anestésico e analgesia

Os animais receberam uma associação anestésica de cetamina e xilazina intramuscular em membro posterior direito, na dose de 60mg/kg e 10mg/kg, respectivamente. Considerou-se o animal em plano anestésico cirúrgico quando não havia reflexo de retirada à preensão digital da pata posterior contra-lateral à da anestesia. Quando apresentavam superficialização do plano anestésico, foi realizada complementação com metade da dose inicial. Para analgesia pós-operatória, foi utilizado 5mg/kg de Tramadol, via intramuscular, a cada 8 horas.

Modelo experimental de obstrução e isquemia intestinal

O modelo de obstrução intestinal foi descrito por Mulvihill e colaboradores em 1988[49], sendo o acréscimo da isquemia por ligadura dos vasos proposto por Zanoni e colaboradores em 2009[34]. A técnica operatória prevê incisão mediana no abdome do animal, com identificação do ceco e íleo terminal, com ligadura subsequente da alça de delgado a 1,5 cm da válvula íleo cecal e dos vasos mesenteriais que irrigam segmento entre 7 e 10 cm até o ponto da ligadura (Figura 1).

Figura 1. Fotografia mostrando íleo terminal, ceco e o suprimento vascular do mesentério (à esquerda) e Fotografia mostrando ligadura dos vasos do mesentério e da extremidade do íleo (seta azul, à direita).

A parede abdominal foi fechada com fio de Nylon 3.0 e o animal encaminhado ao biotério para plena recuperação. Permaneceu por 6 horas, de acordo com estudo inicial[50] com livre acesso a água. Após este período, foi submetido a nova anestesia, abertura da cavidade abdominal e ressecção do segmento obstruído, anastomose término-terminal com fio de Polipropileno 6.0 das extremidades ileais, sendo então randomizados em quatro grupos (Figura 2).

Figura 2. Fotografias mostrando segmento intestinal isquêmico, com alça distendida a montante (seta azul, à esquerda), mostrando segmento comprometido ressecado (seta azul, ao centro) e mostrando anastomose de intestino Delgado (seta azul à direita).

Após a enterectomia com anastomose e reanimação volêmica, os animais foram encaminhados novamente ao biotério, com livre acesso a água e comida, permanecendo por 24 horas.

Eutanásia e descarte de animais

Após as 24 h do tratamento, a eutanásia foi realizada por exanguinação, sob anestesia, após a coleta dos tecidos. O descarte das carcaças, devidamente acondicionadas em sacos de cor branca leitosa, etiquetados, foi realizado conforme orientado na Cartilha de Orientação para Descarte de Resíduo no Sistema FMUSP-HC.

Gasometria e lactato arteriais, leucograma e granulócitos

As avaliações de leucometria e granulócitos foram realizadas por coleta de 0,01 mililitros de sangue da ponta da cauda do animal, analisados em aparelho automático Mindray BC-2800Vet (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd. China).

As avaliações de gasometria e de lactato arteriais foram realizadas no momento da reoperação e 24 horas após reanimação, por coleta de 0,1 mililitros de sangue coletados da artéria carótida direita no momento da reoperação, e por punção direta da aorta no momento da eutanásia, sendo analisados em aparelho automático Radiometer ABL 555 (Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark).

IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ em rins e pulmões

Para a análise de citocinas, os tecidos dos rins e pulmões foram homogeneizados numa solução contendo 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100 e 2 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo - Sigma). Para cada amostra foi adicionado 1 μ l / ml de coquetel inibidor de protease (Sigma) seguido de centrifugação a 11.000 g durante 10 minutos a 4 ° C. Os sobrenadantes foram recolhidos para a detecção dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ nos homogeneizados, determinados por ELISA de sanduíche utilizando reagentes fornecidos por R & D Systems (Minneapolis, MN, EUA).

Os ensaios foram realizados em acordo às instruções do fabricante. As placas foram primeiramente recobertas com os anticorpos e acondicionadas em câmara úmida por 18 horas a 4°C, incubadas com as amostras e recombinantes por

2 h/TA e, em seguida, foram lavadas em PBST (Solução salina fosfato tamponada com Tween 20). Anticorpos biotinilados anti IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ foram adicionados às placas (100 μ L/poço) e realizada nova incubação de 2 h/TA. Outras três lavagens em PBST foram feitas e adicionados 100 μ L/poço do conjugado estreptoavidina-peroxidase.

As placas foram novamente incubadas por 30 min/TA e em seguida, outro ciclo de três lavagens foi realizado e a reação revelada pela adição de 100 μ L/poço do substrato contendo o cromógeno TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine - eBioscience). A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico solução 0,2 M e as placas lidas a 450 nm num leitor de ELISA automático (Molecular Devices Spectramax- LLC, CA, EUA). As amostras foram quantificadas por diluições seriadas por comparação com curvas padrão de citocinas recombinantes purificadas e os valores expressos como a média de amostras individuais em pg / mL.

Ensaio microbiológicos em linfonodos mesenterias e outros tecidos

Amostras dos linfonodos mesentéricos, fígado, baço e pulmões foram obtidas dos animais, 24 horas após a realização da enterectomia e reanimação. Estes tecidos foram macerados e homogeneizados em solução salina fisiológica 0,9% estéril. As amostras foram semeadas em meio de cultura Mac Conkey (MC) (Difco®) e incubadas por 24 a 48 horas a 37°C. As colônias de *E. coli* foram identificadas e contadas manualmente, sendo expressas em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido.

A translocação bacteriana foi caracterizada por cultura bacteriana positiva no complexo linfonodal mesentérico, e concomitante presença de bactérias nas amostras de pulmão, fígado ou baço.

Avaliação histológica de rins e de pulmões

Fragmentos do pulmão e rim foram fixados em formalina tamponada a 10% por até 48 horas e incluídos em parafina conforme rotina do laboratório de histopatologia. Foram realizados cortes histológicos a partir dos blocos, medindo de 4 a 5 micrômetros, montados em lâminas de vidro e submetidos à coloração de

hematoxilina e eosina. Os cortes foram digitalizados utilizando o Scanner Panoramic Scan Flash 250, 3D Histech, Budapest, Hungria. As imagens foram analisadas por 1 patologista em dois momentos distintos de maneira cega utilizando para tanto o software de visualização Panoramic Viewer versão 4.5 (3D Histech, Budapest, Hungria).

Foi realizada análise semiquantitativa atribuindo "scores" conforme a intensidade das alterações observadas em cada variável. Os escores variaram de 0 a 4 sendo: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso e 4 – muito intenso. Os parâmetros avaliados no pulmão foram: Edema / Espessamento Septal, Infiltrado inflamatório, Congestão e Ruptura Alveolar. No rim foram avaliados Infiltrado Inflamatório, Congestão, Edema e Hemorragia.

Análise estatística

Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média ou mediana (intervalo interquartis). Os grupos foram comparados pela Análise de Variância (One Way ANOVA) ou Kruskal-Wallis conforme o padrão de normalidade e complementado pelos testes post-hoc Student-Newman-Keuls ou Dunn, respectivamente. Foi utilizado GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, EUA). Adotou-se o nível de significância de 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade

RESULTADOS

Gasometria e lactato arteriais, leucograma e granulócitos

A gasometria coletada 6 horas após a obstrução intestinal e isquemia e antes da reanimação volêmica (Momento 1) foi semelhante entre os grupos e todos os animais foram agrupados e considerados como valores controle único. A gasometria coletada 24 horas após a enterectomia com anastomose e reanimação (Momento 2) foram comparados entre os grupos (Tabela 1).

Na avaliação do pH, o grupo OI no Momento 2 apresentou valor menor/maior comparado ao Momento 1. No Momento 2, os grupos RL, RLNAC e SHNAC apresentaram valores menores comparados ao grupo OI.

Quando comparadas as dosagens de bicarbonato 6 horas após a obstrução intestinal e isquemia (Momento 1) e 24 horas após a enterectomia e reanimação (Momento 2) individualmente em cada grupo, houve aumento dos valores, significante entre o Momento 1 e os grupos OI ($p>0,05$) e RLNAC ($p<0,05$).

Valores do excesso de base obtidos na coleta de 6 horas após obstrução intestinal e isquemia (Momento 1) comparados aos diferentes grupos no Momento 2 apresentaram diferença estatisticamente significante entre esse momento e os grupos OI ($p<0,05$) e RLNAC ($p<0,05$), além do grupo OI vs RL ($p<0,05$).

Os valores de lactato aumentaram em todos os grupos no Momento 2 em relação ao Momento 1, com diferença estatisticamente significante nos grupos RL ($p<0,05$), RLNAC ($p<0,05$) e SHNAC ($p<0,05$).

Tabela 1 - Valores de gasometria arterial coletadas 6 horas após obstrução intestinal e isquemia (Momento 1) e 24 horas após enterectomia e reanimação (Momento 2).

	Momento 1	Momento 2			
		OI	RL	RLNAC	SHNAC
pH	7,3 (7,3-7,4)	7,4 (7,4-7,5)*	7,3 (7,3-7,4) [¶]	7,3 (7,3-7,4) [¶]	7,3 (7,3-7,4) [¶]
Bicarbonato	19,5 (17-23)	24,9 (24-27)*	20,9 (16-24)	25,5 (23-26)*	21,9 (20-27)
Excesso de Base	-4,6 (-7,2--2,1)	1,6 (1,1-2,1)*	-3,5 (-8--1,8) [¶]	-0,2 (-1,6-0,9)*	-4,3 (-6,2-0,5)
Lactato	0,8 (0,6-0,9)	1,6 (1,2-1,7)	2,1 (1,4-3,7)*	1,6 (1,4-2,1)*	1,7 (1,1-3,9)*

Valores expressos em mediana (intervalo interquartis). * $p<0,05$ vs Momento 1; [¶] $p<0,05$ vs OI.

Leucograma

A contagem total dos leucócitos totais e granulócitos foi analisada em todos os animais antes do procedimento cirúrgico inicial (Inicial), 6 horas após obstrução e isquemia intestinal (Momento 1) e isoladamente em cada grupo 24 horas após a realização de enterectomia com anastomose e reanimação (Momento 2).

Não houve diferença estatística quando comparados valores de leucócitos totais nos diferentes momentos e entre os grupos. Entretanto, na avaliação dos granulócitos, houve aumento da contagem, com diferença estatisticamente significativa entre o momento Inicial e o Momento 1 ($p < 0,05$), além do Momento 2 nos grupos RL ($p < 0,05$), RLNAC ($p > 0,05$) e SHNAC ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Valores de leucócitos e granulócitos, expressos em mediana e intervalos inter-quartis, coletados antes da realização da primeira cirurgia (Inicial), 6 horas após obstrução e isquemia intestinal (Momento 1) e 24 horas após enterectomia e reanimação (Momento 2).

	Inicial	Momento 1	Momento 2			
			OI	RL	RLNAC	SHNAC
Leucócitos	13,7 (12-16)	15,7 (12-18)	13,5 (13-18)	14,7 (12-18)	15,8 (12-24)	14,1 (11-21)
Granulócitos	4,4 (3,9-5,5)	10 (8,5-14)*	6,9 (5,7-11)	7,9 (6,2-10)*	6,6 (5-11)*	7,6 (5,4-13)*

Valores expressos em mediana (intervalo interquartis). * $p < 0,05$ vs Inicial.

IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ nos rins

Foram analisadas os níveis de expressão protéica de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ obtidos em tecido renal coletado no momento da eutanásia, sendo comparados e analisados estatisticamente.

Os níveis de IL-1 β foram significativamente menores nos três grupos submetidos a terapêutica (RL, RLNAC e SHNAC) quando comparados ao grupo OI ($p < 0,05$), com o grupo RLNAC tendo níveis significativamente menores quando comparado ao grupo RL.

Os níveis de IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ seguiram o mesmo padrão, com valores significativamente menores nos grupos submetidos a tratamento quando comparados ao grupo OI, porém sem diferença na comparação entre os compostos infundidos.

IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ nos pulmões

Os níveis de expressão protéica de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ obtidos em tecido pulmonar coletado no momento da eutanásia foram analisados e comparados para análise estatística.

As dosagens de IL-1 β e IL-6 foram menores com significância estatística no grupo RLNAC quando comparado ao OI, sem diferença entre os demais. Valores de IL-10 foram menores com significância estatística na comparação dos grupos submetidos a tratamento com o grupo OI, porém sem diferença entre os três.

Valores de TNF- α foram semelhantes do ponto de vista estatístico dos grupos submetidos a terapêutica com o grupo OI, tendo o grupo SHNAC apresentado valores significativamente maiores em relação ao RL e RLNAC. Dosagens de IFN- γ não apresentaram diferença com significância em nenhuma comparação entre os grupos.

Valores expressos em média e erro padrão. * $p < 0,05$ vs OI; # $p < 0,05$ vs RL.

Figura 3 - Dosagem da citocina IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e INF- γ no tecido renal no momento da eutanásia dos grupos submetidos a tratamento comparados ao grupo sem terapêutica (OI).

Valores expressos em média e erro padrão ou mediana e intervalo inter-quartis. * $p < 0,05$ vs OI.

Figura 4 - Dosagem da citocina IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ no tecido pulmonar no momento da eutanásia dos grupos submetidos a tratamento comparados ao grupo sem terapêutica (OI).

Ensaio microbiológicos em linfonodos mesenteriais e outros tecidos

No momento da eutanásia dos animais, 24 horas após a enterectomia com anastomose e reanimação, foram realizadas culturas de linfonodos mesenteriais, baço, fígado e pulmões, para avaliação de translocação bacteriana. Os resultados foram analisados em unidades formadoras de colônias por grama de tecido (UFC/g).

O grupo Referência apresentou culturas negativas em todos os tecidos. As análises estatísticas não demonstraram significância na comparação das culturas entre os grupos por cada órgão analisado. Foram consideradas culturas positivas quaisquer valores encontrados de unidades formadoras de colônias.

Tabela 3 - Contagem de UFC/g nos diferentes tecidos coletados no momento da eutanásia.

	Referência	OI	RL	RLNAC	SHNAC
Linfonodos	0	1613±501	4012±1285	1605±508	1135±443
Baço	0	361±212	1641±1008	394±316	510±450
Fígado	0	136±79	820±503	997±530	191±105
Pulmões	0	916±612	1331±1073	655±365	1346±1138

Valores expressos em media e erro-padrão.

A translocação bacteriana com possível disseminação sistêmica foi considerada quando a cultura foi positiva nos linfonodos e em um ou mais dos outros órgãos avaliados.

Apenas o grupo Referência não apresentou translocação bacteriana, enquanto o grupo OI teve acometimento de linfonodos e outro órgão em todos os casos. Os demais grupos não apresentaram diferença, com oito animais em cada grupo tendo acometimento de outro tecido além do linfonodo.

Tabela4 - Número absoluto de animais com culturas positivas em linfonodo e outro tecido.

Cultura positiva	Referência	OI	RL	RLNAC	SHNAC
Sim	0	8	8	7	8
Não	5	0	1	3	1

Avaliação histológica de rins

Após eutanásia e coleta, os rins foram cortados histologicamente e corados pela técnica de hematoxilina-eosina, sendo avaliados quanto ao grau de edema, inflamação e congestão.

Todas as alterações avaliadas foram graduadas de 0 a 4, sendo 0 a ausência da alteração e 4 o grau mais intenso. As medianas de todos animais de cada grupo foram analisadas estatisticamente.

Tabela 5 - Grade das alterações histológicas renais no momento da eutanásia.

	Referência	RL	RLNAC	SHNAC
Edema	1 (0,5-1,5)	1 (1-2)	2 (1-2)	1 (1-2)
Inflamação	1 (1-1)	1,5 (1-2)	1 (1-1,15)	1 (0,75-1) [#]
Congestão	1 (1-1,5)	2 (1,8-2)	1 (1-2)	1 (1-1,3) [#]

Valores expressos em mediana (intervalo interquartis). # p<0,05 vs RL.

O grau de edema não teve diferença significativa entre os grupos. Os graus de inflamação e congestão foram significativamente menores no grupo SHNAC quando comparados ao grupo RL.

Avaliação histológica de pulmões

Após cortados em lâminas e corados pela técnica de hematoxilina- eosina, os pulmões foram avaliados em relação à edema e espessamento septal, inflamação, congestão e ruptura alveolar.

Os quatro itens avaliados foram graduados de 0 a 4, sendo 0 a ausência da alteração citada, e 4 o grau máximo. Os valores obtidos em cada item de cada animal foram agrupados para análise estatística.

Tabela 6 - Grau das alterações histológicas pulmonares no momento da eutanásia.

	Referência	RL	RLNAC	SHNAC
Edema /Espessamento Septal	1 (1-2)	1 (1-2)	2 (0-2)	0 (0-1)
Inflamação	1 (1-2)	2,5 (2-3)	3 (3-4)*	1 (1-1,3) ^{#,\$}
Congestão	1 (1-2)	2 (1-2)	2 (2-2,3)	1 (1-1) ^{\$}
Ruptura Alveolar	0 (0-0,5)	1 (0-1,3)	1,5 (0,75-2)	0 (0-1)

Valores expressos em mediana (intervalo interquartis). * $p < 0,05$ vs Referência; # $p < 0,05$ vs RL; \$ $p < 0,05$ vs RLNAC.

Em relação ao grau de edema, os grupos não tiveram diferença estatística quando comparados, porém, quando a avaliação deu-se em relação ao grau de inflamação, o grupo RLNAC teve diferença significativa quando comparados ao Referência ($p < 0,05$), e o grupo SHNAC quando comparado aos grupos RL e RLNAC ($p < 0,05$).

O grau de congestão foi significativamente menor no grupo SHNAC quando comparado ao RLNAC ($p < 0,05$), não tendo o grau de ruptura alveolar diferença entre os grupos.

DISCUSSÃO

A avaliação de inflamação nos tecidos renal e pulmonar por meio de dosagem de citocinas demonstrou resultados positivos com emprego de reanimação volêmica, principalmente quando associada a N-acetilcisteína, independente do fluido avaliado.

Os valores de IL-1 β e IL-6 encontrados nos pulmões no momento da eutanásia foram menores nos grupos submetidos a terapêutica quando comparados ao grupo de lesão máxima, com $p < 0,05$ para o grupo RLNAC. O mesmo comportamento em relação a reanimação foi observado em relação aos níveis de INF- γ e IL-10, com significância para o segundo.

Estudo em nosso laboratório realizado por Saad e colaboradores[51] demonstrou redução nos níveis de IL-6 e IL-10 em tecido pulmonar de ratos submetidos a choque hemorrágico quando submetidos a reanimação com Ringer Lactato, porém sem diferença estatística em sua associação ou não com NAC.

Rasslan e colaboradores[39] encontraram em modelo semelhante já citado de obstrução e isquemia intestinal, níveis reduzidos de IL-1 β , IL-6 e IL-10 em tecido pulmonar com emprego de SH associada a Pentoxifilina, infundidos 24 horas após indução da lesão.

O emprego da NAC como terapia para reduzir espécies reativas de oxigênio é amplamente conhecido, além de seu papel considerado profilático, como demonstraram Mani e colaboradores[52] em sua infusão prévia a indução de choque hemorrágico em porcos, com redução dos níveis pulmonares de marcadores de estresse oxidativo.

Em modelo de isquemia intestinal por clampeamento dos vasos mesentéricos de ratos por uma hora, Yang e colaboradores[53] demonstraram redução nos níveis de TNF- α em tecido pulmonar com emprego de solução salina hipertônica.

No presente estudo os níveis de TNF- α nos pulmões foi discretamente menor nos grupos RL e RLNAC em relação ao grupo OI, sem diferença estatística, porém maiores no grupo SHNAC com diferença significativa em relação aos outros dois grupos com intervenção.

Ao analisar a diferença entre os dois estudos, o tempo de isquemia de apenas uma hora, versus 6 horas pode ter influência direta no incremento dos níveis de TNF- α . Em estudo passado na área da oncologia, Delneste e colaboradores[54] demonstraram a capacidade da NAC em aumentar os níveis de expressão de TNF- α por linfócitos T de sangue periférico.

Outro fato que justifica o aumento deste marcador em tecido pulmonar foi comprovado por Petroni e colaboradores[55] em estudo experimental com infusão de LPS em ratos, que tiveram piora dos marcadores inflamatórios e no escore de lesões histológicas neste órgão quando infundida SH 90 minutos após a injúria em comparação com sua utilização com 15 minutos.

A expressão das citosinas pró e antiinflamatórias no tecido renal no momento da eutanásia seguiu um padrão, de ser significativamente maior no grupo sem terapêutica, tendendo a ser menor nos grupos com emprego da NAC associada ao RL, com significância para IL-1 β e IL-6. Ergin e colaboradores[56] atingiram resultados semelhantes em modelo de endotoxemia em ratos, demonstrando redução nos níveis de TNF- α e IL-6 nos rins em relação ao grupo sem terapêutica, comparados ao emprego de NAC associada a solução colóide, com significância na redução dos níveis de ácido hialurônico e óxido nítrico.

Em estudo com infusão de LPS, Hsu e colaboradores[57] demonstraram diminuição nos níveis de uréia e creatinina, além de redução nos níveis séricos de IL-6, IL-10 e TNF- α após administração de NAC, corroborando para sua atividade de proteção renal pela elevação dos níveis intracelulares de Glutathione.

Apesar de não ser significativo, os níveis de IL-6, IL-10 e TNF- α foram superiores no tecido renal do grupo SHNAC em relação ao RLNAC, e o inverso em relação aos níveis de IFN- γ .

A contagem dos granulócitos apresentou o mesmo comportamento em todos os grupos. Houve elevação 6 horas após isquemia e obstrução intestinal em relação ao momento inicial, e queda 24 horas após enterectomia e anastomose, variando com a reanimação utilizada ou não, denotando a indução de resposta inflamatória do modelo, e sua diminuição após a terapêutica cirúrgica. Entretanto, não se observa efeito protetor da NAC.

Antes de estabelecer o intervalo de 6 horas de obstrução e isquemia intestinal, seguida de ressecção do segmento necrosado e coleta de sangue e tecidos 24 horas após, realizamos um estudo para estabelecimento do intervalo de tempo mais adequado para obter translocação bacteriana com sobrevivência que permitisse os estudos de resposta inflamatória[50]. O período de 6 horas em regime de obstrução intestinal associada a isquemia pela ligadura dos vasos ileais mostrou-se eficaz em induzir translocação bacteriana e baixa mortalidade. Outros autores Kapan[58] e Sen[59] desenvolveram experimentos em que mantiveram os animais em regime de obstrução intestinal por 24 horas, entretanto, não associavam a isquemia mesentérica como no presente modelo.

Resultados de gasometria arterial obtidos após o período de isquemia e obstrução intestinal apresentaram variabilidade importante, prejudicando a análise,

tendo como grupo com melhores resultados o grupo OI, gerando dúvidas em relação ao melhor momento para coleta da segunda amostra, que neste caso foi coletada na ocasião da eutanásia. Shih[60] e colaboradores demonstraram melhora dos valores de gasometria arterial obtidos em modelo animal de sepse pela infusão de LPS, após utilização de reanimação com SH em dois momentos, sendo o primeiro precoce, 3 horas após a indução da lesão, e o segundo 9 horas após.

A cultura de linfonodos mesenteriais (LNM) é um método direto de detecção da translocação bacteriana, sendo obtido através de linfonodos excisados do mesentério do íleo terminal e cultivados. Quando há crescimento de colônias, informações como a espécie bacteriana envolvida e a sensibilidade antimicrobiana são obtidas, porém, quando negativa, pode subestimar a real incidência de translocação[61].

CONCLUSÕES

A N-acetilcisteína associada ao RL em modelo animal de obstrução e isquemia intestinal promoveu diminuição de processo inflamatório em rins e pulmões, sem modificar a translocação bacteriana nem as alterações histológicas.

A associação com a SH não resultou em melhora da resposta inflamatória, nem da translocação bacteriana, entretanto, promoveu menor grau de lesão histológica no pulmão.

REFERÊNCIAS

1. Taylor, M.R. and N. Lalani, *Adult small bowel obstruction*. Acad Emerg Med, 2013. **20**(6): p. 528-44.
2. Saúde, M.d., 2016.
3. Cappell, M.S. and M. Batke, *Mechanical obstruction of the small bowel and colon*. Med Clin North Am, 2008. **92**(3): p. 575-97, viii.
4. Gore, R.M., et al., *Bowel Obstruction*. Radiol Clin North Am, 2015. **53**(6): p. 1225-40.
5. Cruz, R.J., Jr., et al., *Regional blood flow distribution and oxygen metabolism during mesenteric ischemia and congestion*. J Surg Res, 2010. **161**(1): p. 54-61.
6. Fevang, B.T., et al., *Complications and death after surgical treatment of small bowel obstruction: A 35-year institutional experience*. Ann Surg, 2000. **231**(4): p. 529-37.
7. Lu, R.H., et al., *Involvement of superoxide anion in the pathogenesis of simple mechanical intestinal obstruction*. J Surg Res, 2003. **115**(2): p. 184-90.
8. Nellgard, P. and J. Cassuto, *Inflammation as a major cause of fluid losses in small-bowel obstruction*. Scand J Gastroenterol, 1993. **28**(12): p. 1035-41.
9. Generoso, S.V., et al., *Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii**. Eur J Nutr, 2011. **50**(4): p. 261-9.
10. Papoff, P., et al., *Gut microbial translocation in critically ill children and effects of supplementation with pre- and pro biotics*. Int J Microbiol, 2012. **2012**: p. 151393.
11. Vaishnavi, C., *Translocation of gut flora and its role in sepsis*. Indian J Med Microbiol, 2013. **31**(4): p. 334-42.
12. Hanna, N., C. Bialowas, and C. Fernandez, *Septicemia secondary to ileus in trauma patients: a human model for bacterial translocation*. South Med J, 2010. **103**(5): p. 461-3.
13. O'Boyle, C.J., et al., *Microbiology of bacterial translocation in humans*. Gut, 1998. **42**(1): p. 29-35.

14. Tarpila, E., et al., *Bacterial translocation during acute pancreatitis in rats*. Eur J Surg, 1993. **159**(2): p. 109-13.
15. Steinberg, S.M., *Bacterial translocation: what it is and what it is not*. Am J Surg, 2003. **186**(3): p. 301-5.
16. MacFie, J., *Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis*. Br Med Bull, 2004. **71**: p. 1-11.
17. Andrade, M.E., et al., *The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models*. Clin Nutr, 2015. **34**(6): p. 1080-7.
18. Bone, R.C., 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*. 1992. Chest, 2009. **136**(5 Suppl): p. e28.
19. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Jama, 2016. **315**(8): p. 801-10.
20. Bamberger, D.M. and M.B. Gurley, *Microbial etiology and clinical characteristics of distributive shock*. Clin Infect Dis, 1994. **18**(5): p. 726-30.
21. Beutler, B., et al., *Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin*. Nature, 1985. **316**(6028): p. 552-4.
22. Tracey, K.J., et al., *Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin*. Science, 1986. **234**(4775): p. 470-4.
23. Muzio, M. and A. Mantovani, *Toll-like receptors*. Microbes Infect, 2000. **2**(3): p. 251-5.
24. Kriegler, M., et al., *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF*. Cell, 1988. **53**(1): p. 45-53.
25. Fischer, E., et al., *Comparison between effects of interleukin-1 alpha administration and sublethal endotoxemia in primates*. Am J Physiol, 1991. **261**(2 Pt 2): p. R442-52.
26. Deitch, E.A., *Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy*. Ann Surg, 1992. **216**(2): p. 117-34.
27. Kilbourn, R.G., et al., *NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(9): p. 3629-32.

28. Baue, A.E., *Multiple organ failure, multiple organ dysfunction syndrome, and systemic inflammatory response syndrome. Why no magic bullets?* Arch Surg, 1997. **132**(7): p. 703-7.
29. Rangel-Frausto, M.S., et al., *The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study.* Jama, 1995. **273**(2): p. 117-23.
30. Astiz, M.E., A. Galera-Santiago, and E.C. Rackow, *Intravascular volume and fluid therapy for severe sepsis.* New Horiz, 1993. **1**(1): p. 127-36.
31. Velasco, I.T., et al., *Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock.* Am J Physiol, 1980. **239**(5): p. H664-73.
32. Horton, J.W. and P.B. Walker, *Small-volume hypertonic saline dextran resuscitation from canine endotoxin shock.* Ann Surg, 1991. **214**(1): p. 64-73.
33. Shields, C.J., et al., *Hypertonic saline enhances host response to bacterial challenge by augmenting receptor-independent neutrophil intracellular superoxide formation.* Ann Surg, 2003. **238**(2): p. 249-57.
34. Zanoni, F.L., et al., *Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction.* Clinics (Sao Paulo), 2009. **64**(9): p. 911-9.
35. Luiz Zanoni, F., et al., *Hypertonic saline solution reduces mesenteric microcirculatory dysfunctions and bacterial translocation in a rat model of strangulated small bowel obstruction.* Shock, 2013. **40**(1): p. 35-44.
36. Bulger, E.M., et al., *Out-of-hospital hypertonic resuscitation following severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial.* Jama, 2010. **304**(13): p. 1455-64.
37. Bulger, E.M., et al., *Out-of-hospital hypertonic resuscitation after traumatic hypovolemic shock: a randomized, placebo controlled trial.* Ann Surg, 2011. **253**(3): p. 431-41.
38. van Haren, F.M., et al., *Hypertonic fluid administration in patients with septic shock: a prospective randomized controlled pilot study.* Shock, 2012. **37**(3): p. 268-75.
39. Rasslan, R., et al., *Inflammatory activity modulation by hypertonic saline and pentoxifylline in a rat model of strangulated closed loop small bowel obstruction.* Int J Surg, 2014. **12**(6): p. 594-600.
40. Chun, L.J., et al., *Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure.* J Clin Gastroenterol, 2009. **43**(4): p. 342-9.

41. Chen, G., et al., *Inhibitory effect on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in rats: a potential neuroprotective mechanism of N-acetylcysteine*. Mediators Inflamm, 2008. **2008**: p. 716458.
42. Wang, 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*. J Clin Immunol, 2013. **33**(3): p. 649-60.
43. 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, 2011. **17**(4): p. 293-7.
44. Csontos, C., et al., *Effect of N-acetylcysteine treatment on the expression of leukocyte surface markers after burn injury*. Burns, 2011. **37**(3): p. 453-64.
45. Csontos, C., et al., *Effect of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress and inflammation after severe burn*. Burns, 2012. **38**(3): p. 428-37.
46. Steckert, A.V., et al., *Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with N-acetylcysteine, vitamins and statins*. Curr Neurovasc Res, 2014. **11**(1): p. 83-90.
47. Festing, S. and R. Wilkinson, *The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research*. EMBO Rep, 2007. **8**(6): p. 526-30.
48. Whitley, E. and J. Ball, *Statistics review 4: sample size calculations*. Crit Care, 2002. **6**(4): p. 335-41.
49. Mulvihill, S.J., et al., *The effect of somatostatin on experimental intestinal obstruction*. Ann Surg, 1988. **207**(2): p. 169-73.
50. Costa RID, Rasslan R, Koike MK, Utiyama EM, Montero EFS. Bacterial translocation and mortality on rat model of intestinal ischemia and obstruction. Acta Cir Bras. 2017;32(8) in press.
51. Saad, K.R., et al., *Pulmonary impact of N-acetylcysteine in a controlled hemorrhagic shock model in rats*. J Surg Res, 2013. **182**(1): p. 108-15.
52. Mani, A., et al., *N-Acetylcysteine and Desferoxamine Reduce Pulmonary Oxidative Stress Caused by Hemorrhagic Shock in a Porcine Model*. J Invest Surg, 2017. **30**(1): p. 33-40.
53. Yang, D.J., et al., *Hypertonic saline activates CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in the small intestine to alleviate intestinal ischemia-reperfusion injury*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014. **18**(20): p. 3069-75.

54. Delneste, Y., et al., *N-acetyl-L-cysteine exhibits antitumoral activity by increasing tumor necrosis factor alpha-dependent T-cell cytotoxicity*. Blood, 1997. **90**(3): p. 1124-32.
55. Petroni, R.C., et al., *Impact of Time on Fluid Resuscitation with Hypertonic Saline (NaCl 7.5%) in Rats with LPS-Induced Acute Lung Injury*. Shock, 2015. **44**(6): p. 609-15.
56. Ergin, B., et al., *Effects of N-acetylcysteine (NAC) supplementation in resuscitation fluids on renal microcirculatory oxygenation, inflammation, and function in a rat model of endotoxemia*. Intensive Care Med Exp, 2016. **4**(1): p. 29.
57. Hsu, B.G., et al., *Post-treatment with N-acetylcysteine ameliorates endotoxin shock-induced organ damage in conscious rats*. Life Sci, 2006. **79**(21): p. 2010-6.
58. Kapan, M., et al., *Thymoquinone ameliorates bacterial translocation and inflammatory response in rats with intestinal obstruction*. Int J Surg, 2012. **10**(9): p. 484-8.
59. Sen, V., et al., *Role of Ankaferd on bacterial translocation and inflammatory response in an experimental rat model of intestinal obstruction*. Int J Clin Exp Med, 2014. **7**(9): p. 2677-86.
60. Shih, C.C., et al., *Effects of small-volume hypertonic saline on acid-base and electrolytes balance in rats with peritonitis-induced sepsis*. Shock, 2012. **38**(6): p. 649-55.
61. Baumgart, D.C. and A.U. Dignass, *Intestinal barrier function*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2002. **5**(6): p. 685-94.