RENATA CAMPOS

**Efeitos da N-acetilcisteína na função pulmonar e renal
em ratos com sepse sob ventilação mecânica invasiva**

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

Programa de Nefrologia
Orientador: Professor Dr. Antonio Carlos Seguro

SÃO PAULO

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Campos, Renata

Efeitos da N-acetilcisteína na função pulmonar e renal em ratos com sepse sob ventilação mecânica invasiva / Renata Campos. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientador: Antonio Carlos Seguro.

Descritores: 1.Acetilcisteína 2.Sepse 3.Estresse oxidativo 4.Mecânica respiratória
5.Lesão pulmonar aguda 6.Insuficiência renal aguda 7.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-101/11

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais,

Angelo e Joana, que por mais que o tempo passe sempre estão dispostos a ajudar seus filhos, com muita dedicação e amor. Pelo apoio e amor incondicional quero compartilhar com vocês a alegria de concluir esta tese.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me sustentou nos dias de maior angústia, que me deu renovo para continuar a execução desta tese.

Ao Professor Dr. Antonio Carlos Seguro, pesquisador com idéias brilhantes, dedicação à medicina e com postura de ser humano íntegro, me conduziu de forma objetiva e segura, me passando toda a confiança necessária para que me sentisse uma pesquisadora. Além de grande incentivador e companheiro nos congressos em que participamos. Obrigada professor, por todo o aprendizado!

À querida Maria Heloisa M. Shimizu (Helô), que proporcionou dias alegres ao laboratório com suas risadas, brincadeiras e conversas. Devo à ela o conhecimento de muitas técnicas aprendidas no LIM 12. Além de excepcional profissional, é uma amiga que sempre me lembrarei com muito carinho e admiração.

Ao Henrique, meu noivo, que esperou pacientemente esses dois anos de minha ausência. Sempre com uma palavra amiga, carinhosa fez a distância entre nós, parecer menor. Além disso, foi um incentivador em todas as etapas desta pesquisa.

Aos meus familiares, Alessandra, Eloi, Reginaldo, Vera, Lucas, Daiana, Giovana (Gigi), Eduardo, que trazem alegria ao meu viver.

Aos amigos e pesquisadores do LIM 12, Rildo, Carol, Talita, Fabíola, que sempre estiveram dispostos a ajudar e ensinar o que fosse necessário para a execução dessa tese. Além de ótimos companheiros de almoço, cafezinhos e bate papo. À todos do LIM 12 que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho.

À Dra Lucia, que gentilmente me ajudou em muitos aspectos profissionais e pessoais. Muito obrigada pela atenção e disponibilidade.

À Cecília, Ciça, que cuida tão bem dos nossos animais, sempre disposta a ajudar os novatos no difícil manejo dos ratos. Obrigada também Ciça, pelos momentos que pacientemente escutou meus desabafos, sempre muito prestativa.

À Eloá, que me ajudou sempre que necessário na parte burocrática. Ao Nivaldo, sempre prestativo, com um senso de humor inesgotável.

À Dra Claudia e Dr. Magaldi, sempre receptivos e solícitos quando havia dúvidas.

Ao professor Dr. Milton Arruda Martins, Clarice Rosa Olivo, Fernanda Lopes e Dra. Thais Mauad, que cederam o laboratório (LIM 20), equipamentos e conhecimento científico para a realização desta tese. Obrigada por todo apoio recebido e pelo carinho.

À Suzi e ao professor Marcelo Amato, do laboratório de pneumologia, que gentilmente permitiram o uso do laboratório e do gasômetro.

À minha querida amiga Malu, que sempre esteve comigo, mesmo com a distância. Uma pessoa que Deus colocou em meu caminho e que me ajudou de uma forma imensurável na minha vida pessoal, sentimental e profissional.

À Universidade do Contestado – em especial ao Ademir Flores e José Alceu Valério, que gentilmente permitiram a minha licença para a realização dessa etapa, além de serem grandes incentivadores pela busca de conhecimento. Aos meus colegas dos cursos de fisioterapia e educação física pelo incentivo à execução deste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro durante os dois anos de execução desta pesquisa.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro 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 Documentação; 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1.0	INTRODUÇÃO	1
1.1	DEFINIÇÃO DA SEPSE	1
1.2	FISIOPATOLOGIA DA SEPSE E DA IRA SECUNDÁRIA A SEPSE	2
1.3	DISFUNÇÃO PULMONAR	9
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO E PAPEL DA N-ACETILCISTEÍNA NA SEPSE.....	15
1.5	MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE – PUNÇÃO E LIGADURA CECAL	19
2.0	OBJETIVOS.....	22
3.0	MÉTODOS	23
3.1	LOCAL	23
3.2	ANIMAIS UTILIZADOS	23
3.3	ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS	23
3.4	PUNÇÃO E LIGADURA CECAL - CLP	25
3.5	MEDIDA DE MECÂNICA RESPIRATÓRIA	26
3.6	GASOMETRIA ARTERIAL.....	30
3.7	MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	30
3.8	HIDRATAÇÃO	30
3.9	AVALIAÇÃO DO EDEMA PULMONAR	31
3.10	CONTAGEM DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES NO TECIDO PULMONAR	32
3.11	CLEARANCE DE INULINA.....	32
3.11.1	Dosagem e cálculo do clearance de inulina	33
3.12	MEDIDA DE FLUXO SANGÜÍNEO RENAL	34
3.13	DOSAGENS DE SÓDIO E POTÁSSIO PLASMÁTICO.....	34
3.14	MEDIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	34

3.15 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA	35
3.16 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	36
3.17 ESTUDO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE MEMBRANA DOS TRANSPORTADORES DE SÓDIO NO PULMÃO	36
3.17.1 Isolamento da proteína da membrana plasmática para imunoblotting	36
3.17.2 Eletroforesis e imunoblotting	37
3.18 HISTOLOGIA	38
 4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	39
 5.0 RESULTADOS	40
5.1 DADOS DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA DOS ANIMAIS SUBMETIDOS À VMI	40
5.2 GASOMETRIA ARTERIAL	42
5.3 ÍNDICE DE EDEMA	46
5.4 CONTAGEM DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES NO PULMÃO	49
5.5 TRANSPORTADORES DE SÓDIO NO PULMÃO	50
5.6 VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS	53
5.7 AVALIAÇÃO SÓDIO E POTÁSSIO PLASMÁTICO	54
5.8 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	55
5.9 FLUXO SANGUÍNEO RENAL	57
5.10 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	58
5.11 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA	59
 6.0 DISCUSSÃO	61
 7.0 CONCLUSÕES	78
 8.0 REFERÊNCIAS	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATB: Antibiótico

Cest: Complacência

Cin: Clearance de inulina

CLP= Punção e Ligadura Cecal

DC= Débito Cardíaco

FC= Frequência cardíaca

FG= Filtração Glomerular

FiO₂= Fração Inspirada de Oxigênio

FR= Frequência Respiratória

GTIS= Resistência do tecido pulmonar

Hb= Hemoglobina

HE: Hematoxilina e eosina

Ht= Hematócrito

HTIS= Elastância do tecido pulmonar

IL= Interleucina

IRA= Insuficiência Renal Aguda

IRC= Insuficiência Renal Crônica

LPA= Lesão Pulmonar Aguda

LPS= Lipopolissacarídeo

MR: Mecânica respiratória

NAC= N-acetilcisteína

NO: Óxido nítrico

PAM: Pressão arterial média

PEEP= Pressão Positiva Expiratória Final

RAW= Resistência das Vias Aéreas

ROS= Espécies Reativas ao Oxigênio

SDMOS: Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos

SDRA= Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SOD= Superóxido Dismutase

TBARS= Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TLC: *Total lung capacity* = Capacidade pulmonar total

TLR: Receptor Toll-like

TNF: Fator de necrose tumoral

UTI= Unidade de Terapia Intensiva

VE= Ventilação Espontânea

VMI= Ventilação Mecânica Invasiva

Vt= Volume Corrente

Z= Impedância

RESUMO

Campos, Renata. **Efeitos da N-acetilcisteína na função pulmonar e renal em ratos com sepse sob ventilação mecânica invasiva [tese]**. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

Introdução: A sepse pode causar alterações renais e pulmonares. Nos casos mais graves, a ventilação mecânica invasiva (VMI) torna-se necessária para melhorar as trocas gasosas e fornecer adequado oxigênio as células. Entretanto, seu uso está associado com piora da função renal. O estresse oxidativo está aumentado na sepse e relaciona-se com o aumento da mortalidade. O uso de um antioxidante como a N-acetilcisteína (NAC) pode ser útil na sepse, por diminuir principalmente o estresse oxidativo. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do NAC na função renal e pulmonar em ratos com sepse em VMI.

Materiais e Métodos: A sepse foi induzida pelo modelo punção e ligadura cecal (CLP) em ratos Wistar. Os grupos estudados foram: G1: Controle, G2: CLP e G3: CLP+NAC (4,8g/L). A ingestão do NAC iniciou-se 2 dias antes da CLP na água de beber e foi mantida até o dia do estudo. A VMI foi definida como: Volume corrente (Vt) de 8 ml/Kg, PEEP de 6 cmH₂O e FiO₂ 50%. Foram analisados 24 horas após a indução da CLP, o clearance de inulina, fluxo sanguíneo renal, gasometria arterial, mecânica respiratória, pressão arterial e estudo dos co-transportadores (NKCC1 e α -ENaC) no tecido pulmonar.

Resultados: A sepse causou importantes alterações na mecânica pulmonar tais como aumento da resistência de vias aéreas (RAW) e da elastância pulmonar (HTIS). Os animais sépticos desenvolveram lesão pulmonar aguda (LPA). O uso de NAC nos animais com sepse melhorou a mecânica respiratória. Observamos nos animais com sepse maior contagem de polimorfonucleares e maior índice de edema pulmonar quando comparados aos animais que ingeriram NAC. O estresse oxidativo diminuiu nos animais com sepse+NAC. Houve um aumento na expressão do canal ENaC nos animais com NAC e isto pode ter contribuído para a melhora do edema pulmonar.

No sistema renal, a sepse causou importante insuficiência renal aguda em 24 horas, entretanto, foi revertida com o uso do NAC. **Conclusão:** O NAC administrado de forma preventiva foi capaz de amenizar as alterações pulmonares e renais causadas pela sepse, no modelo de CLP.

Descritores 1.Acetilcisteína 2.Sepse 3.Estresse oxidativo 4.Mecânica respiratória 5.Lesão pulmonar aguda 6.Insuficiência renal aguda 7.Ratos Wistar

SUMMARY

Campos, Renata. **Effects of N-acetylcysteine on pulmonary and renal function on septic rats in invasive mechanical ventilation [thesis]**. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

Introduction: Sepsis can cause renal and pulmonary alterations. In several cases, the invasive mechanical ventilation can be useful to ameliorate the gas exchange and supplies oxygen to organs and systems. However, the IMV can worsen the renal function by decreasing glomerular filtration rate. The oxidative stress is increased in sepsis and it is associated to high mortality. The use of an antioxidant as N-acetylcysteine (NAC) can be useful in sepsis, mainly by decreasing the oxidative stress. **Purpose:** To evaluate the effects of NAC on renal and pulmonary function in rats with CLP submitted to invasive mechanical ventilation (IMV). **Material and Methods:** The sepsis was induced by cecal and puncture ligation (CLP) in Male Wistar rats. The groups evaluated were: G1: Control; G2: CLP; and G3: CLP+NAC (4,8g/L). The NAC was added to drink water two days before the CLP and keep until the day of study. The IMV was set as Vt: 8 ml/kg, PEEP: 6 cmH₂O and FiO₂: 50%. The inulin clearance, renal blood flow, arterial blood gas, respiratory mechanics, mean arterial pressure and co-transporters (NKCC1 and α -ENaC) on pulmonary tissue was analyzed 24 hours after the CLP procedure. **Results:** Sepsis caused important alterations on respiratory mechanics such as increase in airway resistance (RAW) and in lung

elastance (HTIS). The septic animals developed an acute lung injury. The use of NAC ameliorated respiratory mechanics. The CLP animals had increase in neutrophils polymorphonuclears and edema index when compared to animals with NAC. The oxidative stress was lower in CLP+NAC group. There was an upregulation in channel ENaC in animal with NAC and this can contribute to improve edema index. In renal system, sepsis caused an important acute renal injury in 24 hours, however NAC reverted this clinical condition. **Conclusion:** The preventive use of NAC was able to prevent the pulmonary and renal alterations caused by sepsis, in the CLP model.

Keywords 1. Acetylcysteine 2. Sepsis 3. Oxidative stress 4. Respiratory mechanics 5. Acute lung injury 6. Acute renal injury 7. Wistar rats

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DA SEPSE

A sepse permanece a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes cirúrgicos e vítimas de trauma principalmente devido ao desenvolvimento da síndrome de disfunção múltipla de órgãos (SDMO).

É definida como uma síndrome clínica que resulta de uma complexa interação entre o hospedeiro e o agente infeccioso e é caracterizada pela ativação de vias inflamatórias. Ocorrem mudanças hemodinâmicas, circulatórias e celulares que levam ao desequilíbrio entre o fluxo sanguíneo e necessidades metabólicas que implicam geralmente em SDMO (GUARRILDO *et al.*, 2004).

Inicialmente, o desenvolvimento da sepse causa uma apropriada resposta inflamatória que se torna amplificada e então desregulada. Clinicamente, seu início é insidioso e suas características gerais podem incluir: hipertermia, taquipnéia e edema devido ao balanço hídrico positivo. O paciente numa fase mais avançada pode desenvolver distúrbios hematológicos, hemodinâmicos e sinais de disfunção orgânica (VINCENT, 2008).

A incidência desta doença tem aumentado nos últimos anos, provavelmente devido a progressão da idade populacional, associação de comorbidades e resistência bacteriana (MARTIN *et al.*, 2001).

Apesar de esforços crescentes para manter órgãos vitais e ressuscitar pacientes, a incidência e mortalidade na sepse permanecem muito alta, principalmente quando existe a disfunção orgânica associada, como a insuficiência renal aguda (IRA). Uma possível explicação para essa alta mortalidade ainda seja ao limitado entendimento de toda a fisiopatologia associada à sepse e aos órgãos a distância acometidos por essa síndrome.

1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE E DA IRA SECUNDÁRIA A SEPSE

Na sepse existe íntima relação entre o número de órgãos afetados e a mortalidade. Se quatro ou cinco órgãos estiverem com disfunção, a mortalidade é superior a 90%, independente do tratamento adotado (COHEN, 2002).

O reconhecimento bacteriano e a sinalização são funções essenciais das células do sistema imune. A liberação das endotoxinas da parede celular bacteriana causa anormalidades bioquímicas e fisiológicas que caracterizam a sepse. Os mediadores inflamatórios liberados na sepse são de extrema importância para eliminar vários tipos de patógenos, mas se esta resposta é exacerbada, pode causar uma infecção sistêmica em órgãos distais e levar a morte rapidamente (ZHANG, 2000).

Os mecanismos usados para a resposta de defesa na sepse são dependentes de uma proteína de ligação entre a endotoxina e o receptor CD14, que foi identificado como um essencial co-receptor que atua na ativação dos

monócitos. Embora a descoberta do CD14 representa um significativo passo para o estudo da patogenia da sepse, não estava claro como ocorria a ligação da endotoxina com a proteína que ativava o complexo celular da resposta imune. Esta incerteza foi resolvida com a descoberta dos receptores Toll-like (TLR). Foram identificados 11 tipos destes receptores e cada um tem uma função específica no reconhecimento de patógenos. Os TLR 1, 2, 4, 5 e 6 reconhecem principalmente produtos bacterianos, enquanto o TLR 3, 7 e 8 são específicos para a detecção viral. O TLR 9 parece estar envolvido tanto no reconhecimento viral quanto bacteriano e o TLR 4 é o principal receptor para endotoxina envolvida na ativação do fator nuclear κ B e a síntese de citocinas pró-inflamatórias e tem um papel importante na sepse (COHEN, 2002).

Evidências clínicas demonstraram a importância da expressão dos TLR nos vários tipos de células durante a sepse. Há relatos que a expressão do TLR 2 e 4 em pacientes sépticos encontrava-se significativamente aumentada comparada com a expressão em indivíduos saudáveis (ARMSTRONG, 2004). Em adição, a expressão dos TLR 2 e 4 nos macrófagos hepáticos e esplênicos estava significativamente aumentada em camundongos submetidos a CLP (TSUJIMOTO *et al.*, 2005). O mesmo foi observado nas células pulmonares após 1 hora do início da peritonite. Andonegui *et al.* (2003), descreveram que a expressão do TLR 4, particularmente no endotélio das células alveolares, exercem um papel importante no recrutamento de neutrófilos para o pulmão após o início da endotoxemia, sugerindo que TLRs nas células imunes e não imunes possam estar envolvidas na lesão tecidual durante a sepse.

Uma recente descoberta que parece estar envolvida na patogênese da sepse é o HMGB1 (*High Mobility Group B1*). É uma proteína que participa na estabilização dos nucleossomos, facilita a transcrição gênica e modula os receptores de hormônios esteroidais. É um mediador pró-inflamatório tardio que interage com múltiplos receptores incluindo TLR 2 e 4, atuando na sinalização da inflamação na sepse. Em camundongos injetados com lipopolissacarídeo (LPS), a HMGB1 aumentou significativamente após 24 horas, enquanto os níveis de TNF- α e IL-1 encontravam-se diminuídos. Entretanto os animais melhoraram do choque séptico após a administração de anticorpo para HMGB1 (WANG *et al.*, 1999). Subsequentemente foi demonstrado que pacientes com sepse tinha elevado nível de HMGB1 e que estava associado à maior mortalidade, sugerindo que ações clínicas neutralizando essa proteína podem ser benéficas na recuperação da sepse.

Seguindo a interação inicial entre hospedeiro e bactéria existe uma ampla ativação do sistema imune. A liberação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)1, IL2, fator de necrose tumoral (TNF- α) e outras substâncias, interagem em muitas das características imunopatológicas do choque induzido por endotoxemia. Elas são liberadas nas primeiras horas após o insulto e voltam a ativar um segundo nível de cascata incluindo citocinas, mediadores lipídicos e espécies reativas ao oxigênio, o que resulta no início da migração das células inflamatórias para os tecidos desencadeando todo o processo inflamatório (COHEN, 2002).

As citocinas também exercem um papel importante em induzir um efeito pró-coagulante na sepse. Alterações na coagulação são comuns na sepse e 30 a 50% dos pacientes desenvolvem a mais severa forma clínica que é a coagulação intravascular disseminada. Esta alteração é iniciada por LPS ou outros componentes microbianos, induzindo a expressão do fator tecidual em células mononucleares e endoteliais. O fator tecidual por sua vez, ativa a cascata proteolítica que resulta na conversão da protrombina em trombina, resultando na clivagem do fibrinogênio em fibrina. Como consequência ocorre alteração entre a produção e a remoção da fibrina levando a deposição de placas de fibrina em pequenos vasos sanguíneos, incluindo os capilares glomerulares com alteração na perfusão tecidual e falência orgânica (COHEN, 2002).

A sepse causa grandes repercussões nos órgãos e sistemas. O sistema renal parece ser afetado precocemente com o desenvolvimento da sepse. Miyahi *et al.* (2003) descreveram que 6 horas após a punção e ligadura cecal (CLP) já era evidente edema tubular e degeneração de vacuolar.

A IRA associada à sepse é o maior problema clínico na UTI. Além disso, existem fortes evidências que a sepse e o choque séptico são as causas mais importantes de IRA em pacientes criticamente doentes perfazendo mais de 50% dos casos de IRA na UTI (BELLOMO, 2008).

A IRA é caracterizada pela deterioração da função renal em um curto período de tempo (horas a dias), levando a incapacidade do sistema renal em

excretar escórias nitrogenadas e manter a homeostase do meio interno (THADHANI, 1996).

A patogenia da IRA séptica na clínica é afetada pela falta de dados histopatológicos que descrevam o que acontece no rim humano tal como, diminuição da taxa de filtração glomerular e oligúria (BELLOMO, 2008). Muitas avaliações da função renal são baseadas em testes sanguíneos e urinários, o que muitas vezes não traduz o que está acontecendo com o rim. Infelizmente, a creatinina sérica, não reflete exatamente a taxa de filtração glomerular nos pacientes críticos. Os níveis de creatinina podem aumentar somente quando já existem alterações importantes na histoarquitetura renal (DOI *et al.*, 2009).

A primeira construção para a IRA associada à sepse é devido à isquemia renal secundária ao choque hipodinâmico. Assim, a primeira medida para restaurar a função renal nestes pacientes seria promover adequado fluxo sanguíneo renal. Entretanto, existem muitas controvérsias relacionadas ao fluxo sanguíneo renal, enquanto, estudos descrevem que o fluxo sanguíneo renal na sepse está diminuído, outros relatam que ele está normal ou até aumentado. (BELLOMO, 2008).

Em estudo experimental em IRA séptica, o fluxo sanguíneo renal diminuiu após a indução da sepse. Isto pode ser causado tanto pela diminuição na taxa de filtração glomerular, mas também devido à hipoperfusão tecidual, que se for severa e prolongada, causa deterioração metabólica e diminuição dos fosfatos, possivelmente causando a morte celular, necrose tubular aguda e IRA (WAN, 2008).

O óxido nítrico (NO) também desempenha um papel importante na hipoperfusão renal. A grande produção de NO durante a sepse é responsável pela vasodilatação sistêmica, que resulta em choque séptico. A depleção no volume arterial é detectada pelos barorreceptores que desencadeiam um aumento na atividade simpática e na produção de angiotensina. O resultado final é vasoconstrição com retenção de água e sódio e diminuição na taxa de filtração glomerular (MAJUMDAR, 2010).

O TNF- α tem exercido um papel importante na patogenia da sepse por gram negativo. No sistema renal, a endotoxina estimula a liberação de TNF das células mesangiais glomerulares o que potencializa a lesão renal. Isto ficou claro no estudo de Knoteck *et al.* (2001), que utilizaram um neutralizador do TNF e obtiveram proteção contra a lesão renal induzida pela endotoxina. Neste estudo, a filtração glomerular diminuiu 30% quando comparado aos 75% nos animais que não receberam a neutralização para TNF. Cunningham *et al.* (2002), através de um modelo de sepse por LPS, descreveram que IRA pode ser atribuída ao TNF agindo diretamente no seu receptor no rim, o TNFR1. Os camundongos com deficiência neste receptor foram mais resistentes a IRA. Além disso, apresentaram menor infiltração de neutrófilos e apoptose tubular.

O desequilíbrio entre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, trombose, sangramento, vasodilatação, vasoconstrição, oxidação, atividade anaeróbia e desregulação enzimática contribuem para a patogênese da IRA na sepse. Estas observações sugerem que mecanismos tóxicos e imunológicos são importantes na lesão renal durante a sepse e que fatores hemodinâmicos

não são isolados e podem não ter papel principal na patogenia da IRA secundária à sepse (WAN, 2008; KLENZAK, 2005; WHITE et al, 2011).

Nos casos mais graves de sepse, em que ocorre a SDMOS, a mortalidade aumenta e o uso da ventilação mecânica invasiva (VMI) torna-se indispensável, a fim de restaurar as trocas gasosas e manter adequada oxigenação aos tecidos. Entretanto, seu uso tem sido relacionado com piora da função renal por diminuir taxa de filtração glomerular e clearance de água.

Muito tem sido descrito a respeito da estratégia ventilatória adotada. O uso de volume corrente alto gera um aumento significativo no espaço de Bowman, colapso dos capilares glomerulares e edema perivascular, piorando de maneira significativa a função renal em ratos (VALENZA *et al.*, 2000). Em contrapartida, a utilização da VMI com baixo volume corrente diminui necessidade de hemodiálise (CHERTOW *et al.*, 1998), e também a incidência de IRA (RANIERI *et al.*, 2000).

Atualmente, o rim e o pulmão representam os dois órgãos mais afetados com a SDMOS secundária à sepse. Estudos clínicos e laboratoriais têm demonstrado mecanismos complexos de interação entre a sepse e seus efeitos em órgãos à distância como o rim e o pulmão. A disfunção pulmonar está descrita em modelos sépticos. Entretanto, sabe-se que a IRA, pode acentuar a lesão pulmonar secundária a sepse.

1.3 DISFUNÇÃO PULMONAR

A ocorrência da disfunção pulmonar associada à síndrome séptica é conhecida tanto em humanos quanto em modelos animais.

A lesão pulmonar aguda (LPA) é definido pelo *American-European Consensus Conference* como $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ menor que 300 e radiografia torácica com infiltrado bilateral (BERNARD *et al.*, 1994).

A associação entre lesão pulmonar e sepse afeta aproximadamente 43% de todos os pacientes (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A sepse é a causa primária da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) por induzir uma atividade intensa de mediadores endógenos, seguida de ativação de leucócitos, inflamação intravascular e falência cardiopulmonar (RIVERS *et al.*, 2001).

A sepse e a própria lesão renal podem levar ao desenvolvimento da LPA, contribuindo para a formação de edema pulmonar, o que agrava o quadro séptico. Isto foi elegantemente mostrado por Rabb *et al.* (2004), que estudaram ratos submetidos à nefrectomia bilateral, portanto com insuficiência renal, mas sem insuficiência respiratória e esses animais apresentavam diminuição da expressão pulmonar dos canais transportadores de sódio e água. Estas alterações foram acompanhadas de aumento de permeabilidade vascular e edema intersticial, mostrando claramente a ligação entre insuficiência renal e respiratória.

O pulmão está envolvido nas fases precoces do processo inflamatório que se inicia com ativação de neutrófilos, edema intersticial, perda de

surfactante e exsudato fibrinoso alveolar. Alterações posteriores incluem: infiltrado de células mononucleares, proliferação de pneumócito tipo II e fibrose intersticial (ABRAHAM; SINGER, 2007). As primeiras alterações ocorrem nas células do endotélio vascular com consequente aumento da permeabilidade vascular, congestão, edema intersticial e diminuição dos espaços aéreos.

A causa da lesão permanece obscura, entretanto forças de estiramento induzido pelo recrutamento e desrecrutamento alveolar, a toxicidade do oxigênio, o uso de pressões ou volumes inadequados e ainda pela grande quantidade de reposição volêmica usada para ressuscitação circulatória exercem um papel importante no desenvolvimento da LPA.

A LPA pode ser identificada de diversas maneiras. A medida de mecânica respiratória é uma grande aliada para determinar a severidade da LPA. À medida que intervenções terapêuticas ocorrem ou na presença de patologias pulmonares, a mensuração da mecânica pulmonar permite o diagnóstico da lesão, sendo uma importante medida para acompanhar a progressão da doença pulmonar (BATES, 2009). As propriedades da mecânica respiratória podem ser prejudicadas nas doenças pulmonares como na SDRA secundária à sepse.

As propriedades mecânicas do pulmão podem ser descritas em termos de impedância sob a suposição que ele se comporta como um sistema dinâmico linear. Existe uma variedade de diferentes sinais pertencentes à mecânica pulmonar que podem ser mensuradas. As mais comuns usadas são: fluxo e pressão. Convencionalmente, o fluxo é determinado como entrada do

sistema e a pressão como saída. A medida de mecânica pulmonar feita através da técnica de oscilação forçada tem ganhado destaque para avaliar as alterações pulmonares tanto em animais como em humanos em vários modelos de injúria pulmonar (BATES 2009). Ionescu *et al.* (2010) descreveram que a técnica das oscilações forçadas é sensível as diferentes medidas de mecânica pulmonar esperadas tanto em pacientes saudáveis quanto nos pneumopatas.

Recentemente, um ventilador mecânico foi projetado para auxiliar nas medidas de mecânica respiratória em animais, o *flexiVent* (Scireq, Montreal, Quebec). Este aparelho não somente permite a manutenção da vida em animais sedados e curarizados, como também pode atuar na identificação da mecânica, por permitir que perturbações de volumes arbitrários sejam aplicadas ao pulmão via traquéia com frequências de 20 Hz ou mais (SHUESSLER, 1995; BATES, 2006).

De forma simplista a impedância (Z) é dada pela relação entre a perturbação de volume aplicada na traquéia e a pressão medida no mesmo local.

Neste modelo de técnica de oscilação forçada, a mecânica respiratória é avaliada pela resistência pulmonar (GTIS), elastância pulmonar (HTIS) e resistência nas vias aéreas (RAW). A RAW corresponde às vias aéreas, enquanto o GTIS e HTIS correspondem ao tecido pulmonar (BATES, 2006).

Neste modelo a determinação da Z tem notável precisão em condições patológicas como na lesão pulmonar aguda. (ALLEN, 2004; MORA *et al.*, 2002).

Maior importância tem sido dada a elastância, pois tem sido utilizada como um indicador das condições da caixa torácica e dos pulmões e também como um fator prognóstico em pacientes com severa insuficiência respiratória (GATTINONI *et al.*, 2002).

A LPA contribui para uma alta morbi-mortalidade nos pacientes em UTI. Embora a LPA tenha muitas etiologias, geralmente se manifesta pela alteração da mecânica pulmonar. No modelo de sepse, Castiello *et al.* (1994), relataram diminuição da complacência em ratos após 12 horas da indução da sepse. Em contrapartida, Carvalho *et al.* (2006), não encontraram nenhuma alteração nem na complacência estática, dinâmica ou na resistência das vias aéreas após 08 horas da indução da sepse nos ratos. A presença de hipervolemia pode ser a causa de alteração na elastância em animais sépticos em VMI (SILVA *et al.*, 2010).

As medidas de mecânica pulmonar podem ser alteradas por diversos fatores. No modelo de LPS em porcos, descrito por Azevedo *et al.* (2007), destacaram que o órgão mais lesado foi o pulmão. Foram observadas extensas áreas de colapso alveolar, hemorragia, infarto pulmonar e infiltrado inflamatório provavelmente devido à presença de macrófagos intravasculares pulmonar. Estas células estão presentes dentro das arteríolas pulmonares e na sepse, liberam citocinas que causam hipertensão e edema pulmonar, com consequente alteração na mecânica.

De acordo com Ozdulger *et al.* (2003), o modelo CLP em ratos, promoveu edema intersticial com intensa infiltração de células inflamatórias e

danos importantes na arquitetura pulmonar, além disso, descreveram grande número de células M30 e caspase 3, indicadores indiretos da apoptose que foram encontradas em maior quantidade justamente nas áreas onde havia densa infiltração de neutrófilos nos ratos com CLP.

Estes achados na histologia pulmonar em animais sépticos demonstraram importante comprometimento da função pulmonar devido à peritonite, apesar da falta de um insulto direto no pulmão na sepse.

Tem sido descrito que a piora pulmonar associada à sepse ocorre devido à intensa reposição volêmica, principalmente quando há a insuficiência renal associada (RIVERS, 2001). A presença de balanço hídrico positivo permanece um preditor de resultados nos pacientes com IRA e LPA. Pacientes com IRA sem hipervolemia apresentaram menor incidência de insuficiência respiratória e menor necessidade de VMI (BOUCHARD *et al.*, 2009).

Entretanto, existem evidências que a lesão pulmonar ocorra mesmo na ausência de um balanço hídrico positivo. Modelos experimentais, sem causar um balanço hídrico positivo, cursaram com aumento na permeabilidade vascular pulmonar devido à alteração nos transportadores epiteliais de sódio e água no pulmão de ratos com consequente diminuição do clearance alveolar (RICCI, RONCO, 2010).

A contribuição dos canais transportadores e reguladores de volume no tecido pulmonar já esta bem documentada, entretanto pouco ainda se conhece sobre seu papel na resposta fisiológica, no sistema pulmonar durante a inflamação aguda e sob influência da ventilação mecânica.

No pulmão, o transportador de sódio, ENaC, tem um importante papel. A resolução do edema pulmonar ocorre como resultado do transporte de sódio ativo através do epitélio alveolar via os canais de sódio apical e via Na-K-ATPase. Este fluxo vetorial ativo de sódio produz um gradiente osmótico trans-epitelial que resulta em movimento passivo da água dos espaços aéreos para o interstício alveolar. Em alguns modelos de LPA e nos pacientes com SDRA, a habilidade do pulmão em resolver o edema encontra-se prejudicada (ANDRADE *et al.*, 2007).

Nguyen *et al.* (2007), também descreveram que a severidade da sepse e da lesão pulmonar pode ser determinada pela expressão do co-transportador de sódio, potássio e cloro, conhecido como NKCC1, por regular a barreira pulmonar epitelial e endotelial e influenciar a infiltração de neutrófilos nos espaços aéreos pulmonar. Camundongos com deficiência de NKCC1 com sepse secundária a infecção por *Klebsiella Pneumoniae*, foram protegidos da sepse letal. Além disso, esses animais apresentaram menor hipertermia e um notável aumento no nível de suas atividades, indicando claramente que controlaram melhor a infecção do que os ratos com expressão de NKCC1. Contudo, o NKCC1 diminuído, não melhorou a infecção por aumentar sua resposta imune, visto que a expressão genética do NKCC1 não foi encontrada nos neutrófilos e macrófagos pulmonar (NGUYEN *et al.*, 2007). Os autores sugerem que a expressão de NKCC1 no endotélio pulmonar pode influenciar a função da barreira endotelial, possivelmente por controlar o volume celular. Contudo, o exato papel da NKCC1 ainda não foi esclarecido. A estimulação na

produção de citocina pró-inflamatória pode regular a expressão de NKCC1 nas células epiteliais e endoteliais pulmonares, resultando em edema pulmonar. Com esta possibilidade, os autores descreveram que o edema encontrava-se diminuído em ratos com deficiência na expressão do NKCC1, quando comparado aos outros.

Andrade *et al.* (2007), estudaram hamsters com leptospirose e avaliaram os co-transportadores NKCC1, α -ENaC e Na-K-ATPase. Os autores observaram que no parênquima pulmonar a leptospirose causou uma diminuição da expressão do α -ENaC. A expressão da Na-K-ATPase não foi alterada e a expressão de NKCC1 foi significativamente maior no pulmão dos ratos infectados do que no grupo controle.

O estresse oxidativo também tem papel importante tanto na IRA quanto na LPA. Suas consequências foram descritas em um modelo de rabdomiólise induzindo a IRA com aumento do estresse oxidativo, aumento na permeabilidade e infiltração de células inflamatórias no pulmão, predispondo a formação de edema pulmonar (RODRIGO *et al.*, 2006).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E PAPEL DA N-ACETILCISTEÍNA NA SEPSE

O estresse oxidativo é um fator potencialmente importante na mortalidade dos pacientes com insuficiência renal e mediador de muitas

complicações principalmente cardiovasculares e neurológicas (SIBILLA *et al.*, 2002).

A inflamação pode ser a causa mais importante do aumento do estresse oxidativo. As substâncias oxidantes inativam o NO, estimulando o aparecimento dos polimorfonucleares que, por sua vez, estimulam a mieloperoxidase. Este fato é um elo para o aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial nos pacientes com insuficiência renal. O estresse oxidativo estimula a regulação do fator de transcrição NFkB, que é também um gatilho para a inflamação. Este, por sua vez, potencializa o estresse oxidativo pela geração de mais substâncias reativas pela ativação de leucócitos e macrófagos (PATRICK *et al.*, 1990).

Segundo Rodriguez *et al.* (2009), a peritonite fecal seja resultado da diverticulite, carcinoma de cólon ou ainda trauma abdominal penetrante, não causa somente a liberação de endotoxinas da parede celular bacteriana, mas também a liberação de espécies reativas ao oxigênio (ROS), peroxinitrito e tromboxano que também estão presentes no quadro de sepse. Os elétrons não pareados altamente reativos da molécula de oxigênio produzem radicais superóxidos. A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que cataliza a conversão do superóxido para peróxido de hidrogênio enquanto glutathione catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água. No modelo de peritonite fecal foi descrito que houve uma diminuição significativa na SOD e glutathione, enquanto ocorreu aumento significativo de radicais livres no plasma, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Na sepse, os mecanismos de defesa estão em declínio e falham em diminuir a produção de radicais livres, como resultado, estes causam alterações estruturais e funcionais nos constituintes celulares resultando em lesão celular irreversível (SPAPEN *et al.*, 1998).

Os efeitos deletérios das ROS são determinados principalmente pelo balanço local de antioxidantes e oxidantes (OZDULGER *et al.*, 2003). O uso de antioxidantes parece ser útil em estágios sépticos. A N-acetilcisteína (NAC) é um potente antioxidante e em estudo experimental com sepse, o tratamento com NAC inibiu a produção de citocinas e adesão molecular, diminuiu a translocação bacteriana e reduziu a produção de ROS no tecido pulmonar e melhorou a sobrevivência (RITTER *et al.*, 2004).

O NAC é agente mucolítico, precursor da L-cisteína e glutathione reduzida nas células. A glutathione reduzida está envolvida na manutenção celular do balanço oxidação-redução e protege as células de uma variedade de insultos endógenos e exógenos. É também fonte de grupos sulfidril e removedores de substâncias reativas com o oxigênio ($\text{OH}^\cdot$ e H_2O_2), geradas pela reação dos peroxinitritos como NO e superóxidos (ZAFARULHAH *et al.*, 2003).

NAC inibe a ativação do c-Jun quinase N-terminal (JNK), p38 MAP quinase, reduz a ativação do NFkB, bloqueando o aparecimento do VCAM-1 das células endoteliais e regulando a atividade de expressão de inúmeros outros genes. Também previne apoptose e promove a sobrevivência das células. O NAC pode melhorar a função endotelial por antagonizar os efeitos da geração de ROS intracelular e pelo aumento da viabilidade do óxido nítrico e

pela redução da adesão de leucócitos do endotélio (ZAFARUALHAH *et al.*, 2003; ARUOMA, 1989).

Existem evidências que o NAC pode ser benéfico em condições sépticas. Suas ações farmacológicas incluem a restauração do potencial antioxidante da célula, inibição da agregação neutrofílica, diminuição da produção de citocinas e restauração do óxido nítrico que é vital para a perfusão dos órgãos durante o processo de sepse (SPAPEN *et al.*, 1998).

O uso do NAC no sistema renal já foi descrito por proteger os animais da insuficiência renal aguda isquêmica por contraste radio-iodados e outras drogas nefrotóxicas (TEPEL, 2000; DRAGER *et al.*, 2004). Houve também melhora na função renal em animais com obstrução ureteral bilateral 48 horas após a desobstrução e reverteu a expressão da aquaporina 2 e do eNOS, deprimidas pela obstrução (SHIMIZU *et al.*, 2008).

Na LPA secundária a sepse, o NAC exerce efeitos benéficos. Gürer *et al.*, (2004) descreveram que a administração de NAC (150 mg/kg/dia) mantida por 72 horas após a CLP aumentou significativamente os níveis de glutathione e causou menor lesão no tecido pulmonar quando comparado ao grupo sem tratamento. Além disso, o uso do NAC, em modelo experimental com ratos submetidos à LPA, causou diminuição do extravasamento pulmonar microvascular e da formação do edema pulmonar com consequente melhora da oxigenação (LEFF *et al.*, 1993).

Spapen *et al.* (1998), ao estudarem 32 pacientes com choque séptico em VMI, descreveram que o grupo com NAC (150 mg/kg por 15 minutos e infusão

contínua de 50 mg/kg por 4 horas), melhorou significativamente a complacência pulmonar estática e a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$. Além disso, descreveram diminuição plasmática de IL-8 durante a infusão de NAC, que pode exercer uma função importante na proteção pulmonar em pacientes com choque séptico, visto que os monócitos secretam grandes quantidades de IL-8 em resposta a formação de trombina com consequente deposição de fibrina microvascular.

A CLP constitui um modelo reproduzível e causa lesão orgânica comparável com sepse clínica (REMICK *et al.*, 2000). Assim, torna-se necessária a investigação de novas propostas terapêuticas, através de modelos experimentais que mimetizem a sepse, a fim de melhorar o prognóstico dos pacientes com sepse.

1.5 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE – PUNÇÃO E LIGADURA CECAL

O modelo CLP é atualmente o mais utilizado para investigar as manifestações clínicas da sepse e do choque séptico (NGUYEN *et al.*, 2009).

O uso de modelo animal permite ao investigador elaborar projetos incorporando estudos moleculares e celulares que muitas vezes não é possível realizar nos humanos. Embora os modelos animais sejam alvos de críticas, pois muitas vezes não traduzem exatamente o que acontecem na clínica, eles ainda são os melhores recursos para estudar a fisiopatologia. Modelos experimentais

de sepse têm sido amplamente usados para explorar a patogênese da sepse e para gerar dados pré-clínicos de intervenções terapêuticas (DOI *et al.*, 2009).

No modelo de CLP é feito a ligação distal da válvula ileocecal e a punção do ceco que causa vazamento do conteúdo fecal para o peritônio e consequentemente, bacteremia polimicrobiana. Muitas espécies de bactérias são encontradas no sangue causando inflamação sistêmica progressiva seguida de choque séptico e lesão em múltiplos órgãos. (DOI *et al.*, 2009). Na CLP, ocorre disfunção renal com depleção de volume e aumento rápido da uréia nitrogenada sanguínea, edema tubular epitelial local e degeneração do córtex. Após 24 horas do modelo experimental, ocorreu moderada injúria hepática. No pulmão observaram congestão, hemorragia e inflamação. Portanto, este modelo reproduz uma lesão multi-orgânica em ratos compatíveis com a sepse humana. (MIYAHARA *et al.*, 2003).

A severidade do modelo de CLP é influenciada por três importantes fatores: extensão do ceco ligado, tamanho da agulha usada para a perfuração e suporte pós CLP (DOI *et al.*, 2009).

Na sepse clínica, sabemos que a evolução pode ser influenciada de diversas formas tais como: estratégia ventilatória adotada, presença de radicais livres, citocinas inflamatórias, liberação exacerbada de óxido nítrico. Com base nisso torna-se intrigante avaliar os efeitos da sepse e da N-acetilcisteína na mecânica pulmonar e no sistema renal em ratos com CLP submetidos à VMI.

Desta forma, espera-se aprimorar os conhecimentos na fisiopatologia renal e pulmonar com aplicabilidade clínica nos pacientes com sepse.

2.0 OBJETIVOS

Avaliar se a N-acetilcisteína tem efeito protetor na disfunção pulmonar e renal relacionada á sepse no modelo de punção e ligadura cecal em animais ventilados invasivamente.

3.0 MÉTODOS

3.1 LOCAL

A função renal dos ratos foi estudada no Laboratório de Doenças Renais (LIM 12) da Disciplina de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O estudo de mecânica pulmonar foi realizado no Laboratório de Técnica Experimental I (LIM 20) da Disciplina de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso entre 200 a 250 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (aprovação protocolo nº0748/09).

3.3 ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS

Foram utilizados ratos machos Wistar tratados ou não com NAC. A dose de NAC (4,8g/L) foi iniciada dois dias antes dos animais serem submetidos a

CLP e mantido até o dia do estudo (24 horas após a indução da CLP). O NAC foi adicionado à água de beber dos animais.

Para a avaliação da mecânica respiratória e função renal foram utilizados os seguintes grupos:

G1 - Ratos controle + VMI: esses animais não sofreram nenhuma intervenção cirúrgica.

G2 - Sepses + VMI

G3 - Sepses+ NAC+ VMI

A VMI foi caracterizada por volume corrente de 8 ml/Kg , PEEP de 6 cmH₂O e FiO₂ 50%. Optou-se pelo uso da VMI para reproduzir com fidedignidade o quadro apresentado pelos pacientes com sepse grave. Nos casos de sepse com maior gravidade, a VMI é necessária para manter adequada oxigenação, entretanto, seu uso pode agravar ainda mais o quadro séptico pelo uso da pressão positiva e suas repercussões no débito cardíaco.

Somente na mensuração do clearance de inulina, foram avaliados os grupos em ventilação espontânea (controle, sepse e sepse+NAC), com a finalidade de comparar os possíveis efeitos da ventilação mecânica em relação à ventilação espontânea na taxa de filtração glomerular.

Para realizarmos a mecânica respiratória utilizamos animais somente para esta finalidade. As demais variáveis foram determinadas com o estudo de clearance de inulina.

3.4 PUNÇÃO E LIGADURA CECAL - CLP

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com tribromoetanol 2,5% (1 ml para cada 100 g). Após tricotomia da região abdominal e através da laparotomia, o ceco foi exposto e ligado abaixo da válvula ileocecal. O ceco foi puncionado duas vezes (agulha 16) e levemente pressionado a expelir pequena quantidade de material fecal na cavidade abdominal (MIYAHARA *et al.*, 2003). Foi realizada a sutura na incisão abdominal.

Após a realização da CLP, foi realizada expansão volêmica via intraperitoneal com cloreto de sódio 0,9% na dose de 25 ml/kg. O soro fisiológico, da mesma maneira, foi administrado 6 e 12 horas após a CLP via subcutânea, assim como o antibiótico (ATB) (Imipenem e Cilastatina 500mg), na dose de 14 mg/kg (subcutâneo) após 6 e 12 horas da realização da sepse.

De forma esquemática (figura 1) está representada a ordem cronológica desde o início da sepse até o final do estudo.

Figura 1. Esquema da ordem cronológica do estudo dos animais. ATB= Antibiótico; CLP= punção e ligadura cecal; NAC= N-acetilcisteína.

3.5 MEDIDA DE MECÂNICA RESPIRATÓRIA

A mecânica respiratória foi realizada através do respirador para animais *flexiVent* (SCIREQ, Scientific Respiratory Equipment, Montreal, Quebec). Este aparelho pertence ao LIM 20 (Laboratório de Técnica Experimental I), local onde foi feita a análise da mecânica respiratória.

Para a medida de mecânica respiratória os animais foram sedados (tiopental sódico - 50 mg/kg), traqueostomizados, conectados ao *flexiVent* e curarizados com brometo de pancurônio (1 ml/kg) via intraperitoneal. Os animais foram ventilados com Vt: 8 ml/kg; FR: 90ipm, PEEP: 6 cmH₂O e FiO₂:50%. Contudo, antes da primeira medida de mecânica pulmonar (basal), foi realizada a hiperventilação temporária dos ratos, com FR de 120 ipm por 2

minutos seguidos de uma manobra de *Total Lung Capacity* (TLC), novamente hiperventilado por mais 2 minutos com FR de 120 ipm e seguido da TLC.

Devido à possibilidade de *air trapping* causada pela manobra de recrutamento no início da VMI, a FR foi fixada em 90 ipm e esperou-se 15 ciclos para que a primeira medida (basal) fosse anotada. Esta FR foi mantida até o final do estudo.

Segundo Tobin (1994), a eliminação do esforço inspiratório pode ser feita com a hiperventilação temporária. Esta técnica foi realizada a fim de garantir a ausência de drive respiratório na medida inicial, posterior a isso nenhuma medida de hiperventilação foi realizada. A TLC, é uma manobra de recrutamento, realizada para homogeneizar as condições do sistema pulmonar e reduzir colapso alveolar (SILVA *et al.*, 2010), realizada somente no período basal e/ou quando o animal fosse desconectado do respirador.

As variáveis de mecânica respiratória usualmente analisada são a complacência, resistência e elastância total do sistema respiratório através da equação do movimento no tempo. Entretanto, quando se assume a equação do movimento no tempo, acredita-se que o ar entre de forma homogênea no sistema respiratório, contudo, isso pode variar de acordo com as propriedades do sistema respiratório. A técnica das oscilações forçadas, que considera o sistema pulmonar de forma multicompartimentar, permite a análise de diferentes compartimentos pulmonares como a resistência das vias aéreas (RAW), resistência (GTIS) e a elasticidade do tecido pulmonar (HTIS). Essas

medidas foram realizadas nos seguintes períodos: basal (até 6 minutos do início da ventilação mecânica) e com 120 minutos de VMI.

Ressalta-se que um dos fatores que podem levar ao aumento da RAW é a presença de secreção na via aérea, por isso, sempre que necessário, os animais foram aspirados para que a secreção não influenciasse nos valores de RAW.

Antes da realização das medidas iniciais foi necessário a calibração do sistema por meio da aplicação de oscilação de volume através da cânula traqueal. Primeiramente com a cânula aberta para a atmosfera e posteriormente com a cânula fechada (identificar vazamentos), para obtenção de sinais da posição do cilindro e a pressão do cilindro do respirador. Esta calibração do sistema tem por objetivo corrigir os dados da mecânica, como extrair o valor da resistência proporcionado pela cânula traqueal. Em seguida foi aplicado um sinal de volume por 16 segundos composto por 12 componentes senóides com frequências primas que vão de 0,25 a 19, 625 Hz. As amplitudes das senóides decrescem hiperbolicamente com a frequência. Esse modelo caracteriza um sistema físico composto por duas partes: a real (resistência) e a imaginária (HIRAI *et al.*, 1999).

Para análise da impedância, o sistema utiliza as seguintes equações, descrito por Gomes *et al.*, (2000):

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}, \text{ onde:}$$

O R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inertância das vias aéreas devido a massa de gás na via aérea central sendo desprezível se Z for menor que 20 Hz. G caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H caracteriza a energia acumulada nos tecidos do pulmão, i é a unidade imaginária, f é a frequência (Hz).

Um desenho esquemático do respirador mecânico utilizado é demonstrado na Figura 2. Ressalta-se que embora o estudo tenha sido conduzido em dois laboratórios, todos os parâmetros de ventilação foram idênticos para cada grupo estratificado.

Figura 2: Esquema do respirador para pequenos animais (*flexiVent-Scireq*), utilizado para a coleta dos dados de mecânica respiratória. (Permissão de LOPES, FDTQS; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

3.6 GASOMETRIA ARTERIAL

Foi colhido 0,2 ml de sangue arterial através de uma seringa de 1 ml heparinizada através da artéria carótida previamente cateterizada. Os gases arteriais foram analisados através do aparelho ABL 800 (Radiometer; Copenhagen, Denmark), com 30 minutos de VMI e ao final de 120 minutos.

3.7 MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram monitoradas durante todo o experimento por meio do monitor de pressão invasiva Biopac, através da artéria carótida conectada ao sensor do monitor. Embora a monitorização fosse constante, para a análise estatística dos dados, foi registrada a PAM e a FC somente no período inicial (30 minutos de VMI) e final (120 minutos de VMI).

3.8 HIDRATAÇÃO

Foi administrado soro fisiológico (25 ml/kg) através da veia jugular com a finalidade de manter a PAM superior a 65 mmHg. Este procedimento foi feito com aproximadamente 60 minutos de VMI. Nos animais, após a expansão volêmica, em que não foi possível manter PAM adequada, foram excluídos do estudo.

3.9 AVALIAÇÃO DO EDEMA PULMONAR

A quantificação de edema por microscopia pode fornecer evidência de lesão pulmonar e/ou edema hidrostático tais como edema alveolar, espessamento do septo alveolar e *cuffing* perivascular (PARKER, TOWNSLEY, 2004).

Utilizamos a medida de *cuffing* perivascular para quantificar o índice de edema pulmonar. As lâminas de pulmão coradas com hematoxilina e eosina (HE), especificamente nas áreas em que foram observados vasos, fotografamos com resolução de 40X pela microscopia óptica. Posterior a isso, quantificamos as seguintes áreas desses vasos: circunferência, diâmetro interno do vaso e área total (figura 3), por meio de um analisador de imagem. A partir dos dados de cada uma dessas medidas, fornecidas pelo software, foi feita uma relação entre a área total e a circunferência do vaso, fornecendo o índice de edema.

Figura 3. Esquematisação de um vaso no parênquima pulmonar. Índice de edema= $\frac{\text{Área total}}{\text{Circunferência}}$.

3.10 CONTAGEM DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES NO TECIDO PULMONAR

Morfometria convencional foi utilizada para determinar a densidade dos neutrófilos polimorfonucleares. As lâminas coradas com HE foram avaliadas por microscopia óptica numa resolução de 100X. Com o auxílio de um retículo que contém 50 retas com 100 pontos e possui área conhecida ($10,000 \mu\text{m}^2$ por 1,000 de ampliação), delimitou-se a área estudada da lâmina. Para cada lâmina foram avaliados 20 campos diferentes. Para cada campo, estabelecido pela área do retículo, realizou-se a contagem dos polimorfonucleares e a partir destes dados foi feita uma relação entre a área avaliada pelo retículo e a contagem das células (VIEIRA *et al.*, 2007).

O examinador não tinha conhecimento dos grupos durante a análise das lâminas.

3.11 CLEARANCE DE INULINA

Para determinação do “clearance” de inulina, os animais foram sedados com tipoental sódico 50 mg/kg. Depois de anestesiados, foram colocados em posição supina em mesa cirúrgica aquecida (37°C) e realizada a traqueostomia através de cateter PE 240, ajustada à luz traqueal de forma que não houvesse vazamentos e fixado com fios de algodão.

As veias jugulares foram cateterizadas com cateter PE-60 para infusão da solução de inulina a 10%, primeiramente como dose inicial (100 mg/Kg) para elevar a concentração desta substância no sangue. A seguir, foi mantida infusão da mesma solução durante todo o experimento, através de bomba de infusão Harvard, numa velocidade constante de 0.04 ml/min. A outra veia jugular cateterizada foi utilizada para controle da anestesia, hidratação e posterior sacrifício dos animais. A artéria carótida foi cateterizada com cateter PE-60, para coleta das amostras de sangue, em diferentes intervalos e, também, para controle da pressão arterial monitorada através de monitor Biopac. A bexiga urinária foi cateterizada com PE-240, para coleta de urina. Quatro (4) amostras de urina foram coletadas em intervalos de 30 minutos.

O tempo de preparo dos animais, para o clearance de inulina, não excedeu 30 minutos de procedimento.

3.11.1 Dosagem e cálculo do clearance de inulina

Para a inulina urinária e plasmática utilizamos o método colorimétrico da Antrona, com leitura em espectrofotômetro 700 Plus FEMTO, comprimento de onda 620 nm. Para o cálculo de inulina utilizamos a seguinte fórmula:

$C_{in} = (U_{in} \times V_u) / P_{in}$, onde:

U_{in} = (concentração urinária de inulina em mg/dl)

P_{in} = (concentração plasmática de inulina em mg/dl)

V_u = (volume urinário em ml/min)

O “clearance” de inulina foi expresso corrigindo-se por 100 g de peso corpóreo, ou seja: **$C_{in} = \text{ml/min} / 100\text{g de peso corpóreo}$**

3.12 MEDIDA DE FLUXO SANGUÍNEO RENAL

Foram feitas medidas do fluxo sanguíneo na artéria renal esquerda no fim do experimento para todos os grupos de animais pelo fluxômetro eletromagnético (T 106 XM; Transonic Systems, Bethesda, USA, MD). Devido à intensa peritonite desenvolvida neste modelo experimental, houve grande dificuldade de avaliar o fluxo renal, portanto esta medida só foi realizada quando possível.

3.13 DOSAGENS DE SÓDIO E POTÁSSIO PLASMÁTICO

Foram dosados através do Fotômetro de Chama, marca Celm.

3.14 MEDIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A peroxidação lipídica gera substâncias reativas com o oxigênio. Algumas delas possuem afinidade com o ácido tiobarbitúrico como o malondialdeído.

As concentrações plasmáticas de TBARS foram determinadas usando o método calorimétrico do ácido tiobarbitúrico. Uma amostra de plasma foi diluída em água destilada. Imediatamente, foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 17,5%, em seguida adicionou-se 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6%, pH 2. As amostras foram colocadas em água fervente por 20 minutos e a seguir resfriadas e adicionou-se por último 1 mL de TCA a 70% e incubadas por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante lido no espectrofotômetro com comprimento de onda de 543 nm contra reagente branco. A concentração dos produtos da peroxidação lipídica foi calculada através do coeficiente de extinção molar equivalente para malondialdeído, de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os níveis de TBARS plasmáticos foram expressos em nmol/mL (OHKAWA *et al.*, 1979).

3.15 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

Para a análise da curva de sobrevida foram utilizados três grupos: controle (n=10), sepse (n=25) e sepse+NAC (n=15). Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso a comida e água ou NAC e acompanhados por 72 horas após a CLP. A avaliação acontecia às 07:00, 13:00 e 19:00 horas de cada dia.

Nos animais com sepse e sepse+NAC foi administrado Imipenem e Cilastatina (14 mg/kg) e soro fisiológico (25 ml/kg) a cada 12 horas, sendo administrado às 07:00 e 19:00 horas de cada dia.

Após as 72 horas de acompanhamento, os animais que sobreviveram foram sacrificados com excesso de tiopental sódico.

3.16 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Ao término dos experimentos, os ratos foram sedados profundamente com tiopental sódico, via endovenosa.

3.17 ESTUDO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE MEMBRANA DOS TRANSPORTADORES DE SÓDIO NO PULMÃO

Estudamos os seguintes transportadores de membrana no tecido pulmonar: NKCC1 e α -ENaC.

3.17.1 Isolamento da proteína da membrana plasmática para imunoblotting

Fragmentos da região basal do pulmão foram retirados com os animais anestesiados, colocados em criotubos, imersos em nitrogênio líquido e transferidos para freezer -70°C até o momento da análise. No momento da análise foram homogenizados em uma solução K-Hepes (200mM Manitol, 80

mM Hepes, 41 mM KOH, pH 7.5) associado a um coquetel inibidor de protease (Sigma) em um homogenizador de tecidos e a centrifugação foi feita a 4000 g, 15 minutos a 4°C, para a remoção de toda a célula, núcleo e mitocôndrias. O sobrenadante foi centrifugado a 200000 g por 1 hora para produção de um pellet contendo as proteínas de membrana. A quantificação e concentração da proteína foram determinadas através do método de Bradford.

3.17.2 Eletroforesis e imunoblotting

A proteína correu em minigéis (BioAgency) de poliacrilamida à 10% para NKCC1 e α -ENaC. Após transferência por eletroeluição para a membrana de nitrocelulose, os blots foram tratados com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T (24,2g Tris; 29,2g NaCl; 3,36g EDTA; 1ml Tween20; pH 7.5) por 1 hora e incubados com os respectivos anticorpos de acordo com o datasheet. A marcação foi feita através da *peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody* (anti-rabbit 1:1000, anti-goat 1:5000, Sigma) usando sistema de quimioluminescência (ECL, Amersham). A normatização foi realizada com a hibridização novamente das membranas com a actina (Sigma). Para a densitometria utilizamos o aparelho Image J (NIH Image, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA).

3.18 HISTOLOGIA

Os animais foram sacrificados após o clearance de inulina. O rim direito foi retirado e seus cortes imersos em solução de *methacarn* (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) durante 24 horas. Após esse período a solução foi substituída por álcool 70%. Após a remoção do rim direito, foi feita a perfusão do rim esquerdo com tampão fosfato salino (PBS NaCl 0,15M, tampão fosfato 0,01M, pH 7,4) para lavagem do leito vascular e em seguida com solução fixadora (formalina tamponada 10%). Foram retirados dois fragmentos do rim esquerdo que foram mantidos em solução de formalina tamponada 10% por 24 horas e transferidos para etanol 70%. O tecido renal foi embebido em parafina, cortado em secções de 3-4 μ m e corados com HE.

O tecido pulmonar foi perfundido com tampão fosfato salino (PBS, NaCl 0,15M, tampão fosfato 0,01M, pH 7,4) em temperatura ambiente. Em seguida, foram cortados em fragmentos basais do pulmão direito e fixados em formalina tamponada 10% por 24 horas. Após esse período, o tecido foi transferido para etanol 70% para posterior inclusão na parafina. Os fragmentos pulmonares foram cortados em seções de 4 μ m e os cortes corados pela HE.

4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados foram analisados utilizando-se análise de variância – ANOVA one way e pós-teste Newmann- Keuls, pelo programa de estatística, GraphPad (versão 5.0). Os resultados foram apresentados com média $\pm$ erro padrão, sendo considerados significantes quando $p < 0.05$.

Para avaliação da curva de sobrevida foi utilizado foi usado o Log-rank (mantel-cox) test e foi considerado significativo se $p < 0,05$.

5.0 RESULTADOS

Antes de realizar a ventilação mecânica e os procedimentos do protocolo de estudo, observamos que os animais após serem submetidos ao modelo experimental de sepse, apresentaram piloereção, olhos incrustados e letargia caracterizada pela redução do estado de alerta e mobilidade.

Foram estudados ratos Wistar, machos, com peso entre 200 – 250 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP. Ressalta-se que foram utilizados animais somente para realizar a mecânica respiratória (MR) e animais somente para o clearance de inulina (CIN). Entretanto, os animais demonstravam características semelhantes.

A ingestão do NAC, na água de beber, foi iniciada dois dias antes da realização a CLP permanecendo até o dia de estudo. Cada animal ingeriu em média 49,5 ml de NAC durante dois dias. Do dia da realização da CLP até o dia do estudo (24 horas), os animais ingeriram em média 8 ml de NAC cada um. Nos animais que tomaram água, a média de ingestão por dois dias foi de 50 ml.

5.1 DADOS DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA DOS ANIMAIS SUBMETIDOS À VMI

Os primeiros dados apresentados são da mecânica respiratória, realizada através do aparelho *flexiVent*.

Como podemos observar na tabela 1, existem alterações importantes na mecânica respiratória nos animais com sepse no início da VMI (30 minutos de VMI). Esses animais apresentaram aumento significativo na RAW (resistência das vias aéreas) e no HTIS (corresponde à elasticidade pulmonar). Entretanto, o uso do NAC normalizou todos esses parâmetros. Um dado, que não se destaca como uma variável de mecânica respiratória e sim, como um dado de monitorização da ventilação mecânica é a pressão de pico. Notamos que somente os animais com sepse apresentaram valores mais elevados de pressão de pico do que os dos grupos controle e séptico + NAC.

Tabela 1. Dados da mecânica e monitorização respiratória – Início VMI

GRUPOS	RAW	HTIS	GTIS	P.PICO
	(cmH ₂ O.s/ml)	(cmH ₂ O/ml)	(cmH ₂ O/ml)	(cmH ₂ O)
Controle (n=7)	0,01±0,001	1,22±0,07	0,33±0,05	9,0±0,25
Sepse (n=7)	0,03±0,007^d	2,58±0,37^{b,c}	0,57±0,11	10,2±0,25^a
Sepse+NAC (n=6)	0,01±0,002	1,58±0,34	0,42±0,07	8,6±0,33

^a p<0,05: vs. Sepse+NAC e Controle ; ^b p=0,01: vs. Controle; ^c p=0,01: vs. Sepse+NAC; ^d p=0,01: vs. Controle; Sepse+NAC; P.PICO= pressão de pico

Na tabela 2, estão expressos os dados relativos ao final da ventilação (120 minutos). Observamos que os animais sépticos sem tratamento apresentam RAW e HTIS elevados comparados com o controle. O NAC

novamente foi capaz de melhorar esses parâmetros. Os outros resultados não foram diferentes entre os grupos.

Tabela 2. Dados da mecânica e monitorização respiratória – Final VMI

GRUPOS	RAW (cmH ₂ O.s/ml)	HTIS (cmH ₂ O/ml)	GTIS (cmH ₂ O/ml)	P.PICO (cmH ₂ O)
Controle (n=7)	0,01±0,002	2,27±0,23	0,49±0,06	10,2±0,20
Sepse (n=7)	0,03±0,005^a	3,53±0,50^b	0,52±0,16	10,0±0,20
Sepse+NAC (n=6)	0,01±0,003	2,14±0,14	0,41±0,05	9,7±0,25

^a p=0,03: vs. Controle; vs. Sepse+NAC; ^b p=0,03: vs. Controle; vs. Sepse+NAC; P.PICO= pressão de pico nas vias aéreas

5.2 GASOMETRIA ARTERIAL

Os dados da tabela 3 mostram a gasometria dos animais colhida com trinta minutos de ventilação mecânica.

Quando fizemos a análise de variância entre todos os grupos, observamos que os animais sépticos apresentaram valores significativamente menores de pH, PaO₂, bicarbonato e saturação, quando comparados ao controle. Os animais com sepse+NAC apresentaram melhores condições gasométricas do que os sépticos sem tratamento.

Tabela 3. Gasometria arterial com 30 minutos de VMI

	pH	PaO₂ (mmHg)	PaCO₂ (mmHg)	Bic (mmol/l)	SaO₂ (%)
Controle (n=6)	7,41±0,06	164,0±1,3	32,7±1,5	19,0±1,08	97,3±1,4
Sepse (n=10)	7,30±0,02^a	105,2±23,5^a	34,8±3,5	16,9±1,5^{a b}	83,0±2,8^a
Sepse + NAC (n=6)	7,33±0,05	155,0±38,5	44,2±6,0	21,0±0,8	91,3±3,2

^a p<0,05: vs.Controle; ^b p<0,05 vs. Sepsis+NAC.

Na tabela 4, podemos observar a gasometria colhida no final da VMI (120 minutos). Nota-se que os animais sépticos apresentaram acidose metabólica. Nos animais com sepsis+NAC Observamos níveis próximos a normalidade de pH e bicarbonato.

Tabela 4. Gasometria arterial com 120 minutos de VMI

	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	Bic (mmol/l)	SaO ₂ (%)
Controle (n=6)	7,36±0,02	143,8±10,6	34,9±6,0	17,5±2,6	97,5±0,1
Sepse (n=10)	7,28±0,03	77,9±3,3	32,7±3,7	13,8±1,3^a	88,2±1,1
Sepse + NAC (n=6)	7,37±0,05	167,0±46,5	37,4±2,8	19,7±1,5	97,1±10,4

^a p<0,05: vs. Sepse+NAC

Avaliamos também através da gasometria arterial, a relação PaO₂/FiO₂ que é um indicativo de injúria pulmonar. Valores ≥ 300 indicam capacidade de oxigenação normal. Valores menores que 300 indicam um processo LPA e menor que 200 pode indicar um processo de SDRA. Na nossa avaliação, seguindo os critérios da PaO₂/FiO₂ (gráfico 1) podemos dizer que os animais sépticos apresentaram LPA (170,3±28,7) quando comparados ao grupo controle (329,3±2,17, p=0,002). Os animais com sepse+NAC embora apresentassem LPA, o grau de severidade foi menor (281,5±21,5, p=0,002).

Gráfico 1. Relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ com 30 minutos de VMI

* $p=0,002$: Controle vs. Sepse; Sepse vs. Sepse+NAC

Analizamos pela gasometria arterial a hemoglobina, hematócrito e lactato. Estes dados, no início da VMI, foram semelhantes entre os grupos, entretanto, notamos aumento significativo do lactato no grupo séptico quando comparado ao do controle e sepse+NAC. Nos animais com NAC, o nível de lactato arterial diminuiu de forma significativa (tabela 5).

Na tabela 6 estão descritos os valores finais de hemoglobina, hematócrito e lactato. Observa-se que tanto o hematócrito quanto a hemoglobina diminuíram para todos os grupos, sem significância estatística entre eles. Contudo, observamos um aumento significativo no lactato arterial dos animais com sepse sem NAC. Já o uso de NAC na sepse foi capaz de diminuir o lactato nestes animais.

Tabela 5. Dados de Hemoglobina, hematócrito e lactato – Início VMI

Grupos	Hemoglobina	Hematócrito	Lactato
Controle (n=6)	11,52±0,36	35,88±1,27	1,07±0,20
Sepse (n=10)	11,46±0,47	35,32±1,41	3,4±0,55^a
Sepse+NAC (n=6)	12,40±1,30	38,07±4,0	1,6±0,10

^a p=0,01: vs. Controle; vs. Sepse+NAC

Tabela 6. Dados de Hemoglobina, hematócrito e lactato – final VMI

Grupos	Hemoglobina	Hematócrito	Lactato
Controle (n=6)	10,3±0,28	32,0±0,86	1,8±0,50
Sepse (n=10)	9,3±0,71	29,0±2,0	5,1±0,61^{a b}
Sepse+NAC (n=6)	10,4±0,72	32,3±2,2	2,1±0,27

^a p=0,0005: vs. Sepse+NAC; ^b p<0,05: vs. Controle

5.3 ÍNDICE DE EDEMA

Um índice utilizado para avaliar o grau de edema pulmonar foi à relação entre a área total e a circunferência dos vasos presentes no parênquima pulmonar visualizados via microscopia. Podemos observar através do gráfico 2, que os animais sépticos sem NAC apresentaram grau de edema significativamente maior que o controle (18,94±1,71 vs. 13,9±0,75 μm , p<0,05).

Contudo, os animais sépticos que tomaram NAC obtiveram menor índice de edema ($12,47 \pm 0,73$) quando comparados aos sépticos sem NAC ($p=0,001$).

Gráfico 2. Índice de edema avaliado pela histologia pulmonar

$p=0.001$: Sepse vs. Sepse+NAC; * $p<0.05$: Controle vs. Sepse

Observou-se através da análise histológica, numa resolução de 40 vezes, que os animais sépticos apresentaram visualmente maior índice de edema, enquanto que os tratados com NAC tinham aparência semelhante ao controle (figura 4). A figura 4A corresponde aos animais controle, sem existência de edema perivascular. A figura 4B representa o grupo sepse sem tratamento onde encontramos importante *cuffing* perivascular e a figura 4C caracteriza os animais com sepse+NAC que visualmente são semelhantes ao controle.

Figura 4. Edema pulmonar pela histologia

É interessante notar que, mesmo com a hidratação, com o propósito de manter a PAM ≥ 65 mmHg, não houve diferença estatística quanto ao volume de expansão dado aos animais sépticos sem NAC ($5,9 \pm 0,08$ ml), se comparados com os animais tratados com NAC ($6,2 \pm 0,2$ ml). Assim, não houve influência da expansão volêmica na formação de edema pulmonar nos animais sépticos.

5.4 CONTAGEM DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES NO PULMÃO

No grupo séptico obtivemos valores maiores de células inflamatórias ($764,4 \pm 39,3 \text{ mm}^2$) quando comparado ao controle ($p=0,01$). No grupo sepse+NAC houve diminuição na quantidade de polimorfonucleares ($654,9 \pm 96,08 \text{ mm}^2$), entretanto sem diferença estatística, quando comparado ao grupo séptico sem NAC, conforme gráfico 3.

Gráfico 3. Polimorfonucleares no tecido pulmonar.

* $p=0,01$: Sepse vs. Controle

5.5 TRANSPORTADORES DE SÓDIO NO PULMÃO

No tecido pulmonar foram avaliados, através de Western Blot, os seguintes transportadores: NKCC1 e α -ENaC.

A densitometria do NKCC1 nos animais sépticos sem NAC foi maior que o do grupo controle ($167,0 \pm 16,3\%$ vs. $100,0 \pm 5,0\%$, respectivamente). Entretanto a administração de NAC diminuiu a expressão desta proteína ($117,0 \pm 22,3\%$), contudo não houve diferença estatística. Os dados estão expressos no gráfico 4. A expressão dos imunoblots dessa proteína pode ser vista na figura 5.

Gráfico 4: Densitometria NKCC1 no tecido pulmonar

*p=0,04: Controle vs. Sepsis

Figura 5: Expressão dos imunoblots- NKCC1

Nos animais com sepse encontramos no pulmão uma diminuição da expressão da proteína α -ENaC ($86,50 \pm 7,94\%$) quando comparados aos do grupo controle ($100,0 \pm 7,43\%$). Os animais com sepse+NAC apresentaram um aumento da expressão desta proteína, quando comparados aos do grupo sepse sem tratamento ($120,3 \pm 6,4\%$, $p=0,04$). A densitometria pode ser observada no gráfico 5 e a expressão dos imunoblots na figura 6.

Gráfico 5- Densitometria do α -ENaC no tecido pulmonar

*p=0,04: Sepsis vs. Sepsis+NAC

Figura 6. Imunoblots do α -ENaC

5.6 VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS

Observamos através da tabela 7, que os animais sépticos, no início da VMI, apresentaram hipotensão. Contudo, o uso do NAC preveniu uma hipotensão mais severa. A FC foi maior nos animais sépticos tratados ou não quando comparados aos do grupo controle.

Tabela 7. Dados hemodinâmicos com 30 minutos de VMI

Grupos	PAM	FC
Controle (n=6)	129,0±5,0	380,0±60,0
Sepse (n=10)	70,0±4,0^{a b}	482,0±33^c
Sepse+NAC (n=6)	118,6±7,3	576,4±11,1^d

^a p<0,0001: vs. Sepse+NAC; ^b p<0,05: vs. Controle

^c p=0,007: vs. Controle; ^d p=0,007: vs. Controle

Após duas horas de VMI (tabela 8), observamos que os animais sépticos continuaram hipotensos, entretanto com o uso do NAC houve uma tendência de melhora na PAM (p=0,08). Não observamos diferença na FC.

Tabela 8. Dados hemodinâmicos com 120 minutos de VMI

Grupos	PAM	FC
Controle (n=6)	108,2±7,0	438,0±33
Sepse (n=10)	77,0±10,1	489,0±34,1
Sepse+NAC (n=6)	93,6±8,8	553,0±20,4

Ns entre os grupos

5.7 AVALIAÇÃO SÓDIO E POTÁSSIO PLASMÁTICO

Para a análise de sódio e potássio, a amostra sanguínea foi colhida 30 minutos após o início da VMI. Não observamos diferença estatística entre os grupos, tanto para a análise de sódio quanto para potássio (tabela 9).

Tabela 9. Sódio e Potássio plasmáticos com 30 minutos de VMI

Grupos	Na⁺	K⁺
Controle (n=6)	144,0±2,27	3,2±0,21
Sepse (n=10)	146,5,0±3,30	3,27±0,19
Sepse+NAC (n=6)	148,3±1,40	2,86±0,36

Ns entre os grupos

5.8 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

A medida de função renal em ratos é expressa através do clearance de inulina (padrão ouro), que avalia a taxa de filtração glomerular. Estudamos animais em ventilação espontânea para analisar de uma maneira simplista se a ventilação mecânica causa alguma alteração na função renal.

Nos animais em VE (gráfico 6), observamos importante diminuição da filtração glomerular no grupo com sepse quando comparado ao controle ($p<0,0001$). Quando utilizamos NAC nos animais com sepse encontramos melhora na insuficiência renal ($p<0,0001$).

Notamos que os animais com sepse em VMI (gráfico 7) , desenvolveram insuficiência renal aguda quando comparados ao grupo controle ($p=0,0006$). Novamente o NAC foi capaz de melhorar a função renal nos animais sépticos, praticamente normalizando os valores de filtração glomerular ($p<0,05$).

Gráfico 6: Clearance de inulina animais em ventilação espontânea

a: $p < 0,0001$: Controle vs. Sepse+VE; b: $p < 0,0001$: sepse+VE vs. Sepse+NAC+VE

Gráfico 7. Clearance de inulina nos animais em VMI

a: $p = 0,0006$: Controle vs. Sepse+VMI; b: $p < 0,05$: Sepse+VMI vs. Sepse+NAC+VMI

É importante destacar que numa primeira instância, a VMI não prejudicou a função renal. Isto pode ser observado quando comparamos os valores de clearance de inulina nos animais controle em VMI vs. VE (tabela 10).

Tabela 10. Clearance de inulina animais em VE e em VMI

	CIN – VE	CIN – VMI	p
	(mL/kg/100g PC)	(mL/kg/100g PC)	
Controle	0,84±0,02 (n=10)	0,83±0,04 (n=6)	Ns

Sepse	0,51±0,04 (n=12)	0,45±0,08 (n= 10)	Ns
Sepse+NAC	0,80±0,05 (n=12)	0,78±0,12 (n=6)	Ns

Ns: não significativa; PC: peso corpóreo; VE: ventilação espontânea; VMI: ventilação mecânica invasiva.

Observamos o volume urinário (tabela 11) dos animais em VMI e em VE, para avaliar se ocorria alguma alteração no débito urinário. É interessante notar que os animais sépticos com ou sem NAC apresentaram menor volume urinário em relação aos do grupo controle, independente da VMI ($p<0,001$) ou em VE ($p=0,001$). A utilização da ventilação por pressão positiva, não afetou o débito urinário nos animais com seps.

Tabela 11. Volume urinário (VU) nos animais em VE ou VMI

	VU- VE (mL/min)	VU – VMI (mL/min)	P
Controle	0,05±0,004 (n=10)	0,04±0,04 (n=6)	Ns
Sepse	0,013±0,002 (n=12)	0,012±0,002 (n=10)	Ns
Sepse+NAC	0,011±0,0009 (n=12)	0,016±0,003 (n=6)	Ns

Ns: não significativa

5.9 FLUXO SANGUÍNEO RENAL

Não observamos diferença estatística entre os animais sépticos com ou sem NAC (3,83±0,44 vs. 3,60±0,41 ml/min, respectivamente). A única diferença ocorreu no grupo controle (6,9±0,06 ml/min), quando comparado aos dois grupos sépticos ($p=0,0002$).

5.10 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Ao analisarmos o TBARS plasmático, observamos no gráfico 8, diferença significativa entre o grupo séptico e o grupo controle ($4,77 \pm 0,13$ vs. $2,04 \pm 0,20$ nmol/ml, $p < 0,001$, respectivamente). Os animais tratados com NAC apresentaram menor estresse oxidativo quando comparados ao séptico sem tratamento ($3,7 \pm 0,21$ nmol/ml, $p < 0,05$).

Gráfico 8. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico –TBARS

* $p < 0,001$: Controle vs. Sepse; # $p < 0,05$: Sepse vs. Sepse+NAC

5.11 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

Na análise da curva de sobrevida dos animais controle, com sepse e sepse+NAC, observamos que, no grupo sepse+NAC ocorreu aumento significativo na sobrevida quando comparado ao grupo séptico sem tratamento ($p=0,01$). Contudo, a mortalidade nos grupos sépticos tratados ou não com NAC foi significativamente maior quando comparados ao controle, como podemos observar no gráfico 9. A taxa de mortalidade entre todos os grupos pode ser observada na tabela 12.

Gráfico 9. Análise de sobrevida em 72 horas de seguimento após sepse

* $p=0,01$: Sepse vs Sepse+NAC; [#] $p=0,0001$: Controle vs Sepse; [&] $p=0,03$: Controle vs Sepse+NAC

Tabela 12. Mortalidade avaliada por 72 horas após sepse

	Controle (n=10)	Sepse (n=25)	Sepse+NAC (n=15)
12 horas	-	-	2
24 horas	-	13	-
48 horas	-	4	2
72 horas	-	2	1
Mortalidade Total	-	19 (76%)	5 (33,33%)

6.0 DISCUSSÃO

A CLP é amplamente utilizada para o estudo da sepse. É um modelo experimental polimicrobiano com síndrome progressiva sistêmica inflamatória. Como consequência ocorre o choque séptico e disfunção múltipla de órgãos que causam mortalidade de aproximadamente 70%. (DOI *et al.*, 2009). Em nosso estudo, o modelo de CLP em 24 horas, causou importante disfunção respiratória e renal.

A sepse provoca alterações orgânicas importantes, como a disfunção renal e pulmonar. Ronco e Ricci (2010) descreveram que, lesões renais podem trazer prejuízos para o sistema pulmonar e vice-versa em pacientes criticamente doentes.

A sepse é causa primária da SDRA, uma forma severa de LPA, somando aproximadamente 40% dos casos (AYALA *et al.*, 2002). Uma das principais características da SDRA secundária a sepse é a hipoxemia devido ao extenso shunt intrapulmonar, decorrente de áreas de atelectasia e edema pulmonar (MARTIN, BERNARD, 2001).

A fisiopatologia da lesão pulmonar sem um insulto direto é complexo e pode ser causado pela ativação de células inflamatórias. A participação do estresse oxidativo na lesão pulmonar no modelo de CLP tem sido demonstrada. A avaliação histopatológica também confirma a lesão pulmonar causada pela CLP (OZDULGER *et al.*, 2003). O uso do NAC pode minimizar o estresse oxidativo por aumentar a glutathione e reduzir a peroxidação lipídica em

pacientes com choque séptico (ORTOLANI *et al.*, 2000). Embora a CLP não esteja associada a uma lesão pulmonar direta, em nosso estudo ficou claro a presença de LPA, avaliada pela relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, diminuída nos animais sépticos. Embora os animais tratados também demonstrassem LPA, visto que a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ estava menor que 300, a diminuição dessa relação não foi tão severa quando comparada aos animais não tratados.

A presença de LPA tem sido descrita na literatura. Azevedo *et al.* (2007), ao avaliarem porcos submetidos à sepse por LPS, observaram diminuição na $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ após 12 horas da LPS. Em pacientes com choque séptico, a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ foi descrita como menor que 150, tanto no início da admissão quanto em 24 horas na UTI (SPAPEN *et al.*, 1998).

O uso do NAC em pacientes com LPA tem mostrado reduzir os sintomas e duração da lesão pulmonar, presumivelmente agindo como um antioxidante e restaurando a glutatona (KAO *et al.*, 2006). Embora ocorra melhora na oxigenação e redução da necessidade de VMI com o uso do NAC, sua eficácia é potencializada quando administrado em uma fase precoce da LPA, quando a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ for próxima a 300. Em pacientes com LPA, dos quais 45% tem como evento primário a sepse, baixa dose de NAC (40 mg/kg por 3 dias) melhorou significativamente a oxigenação sistêmica e diminuiu suporte ventilatório (SUTER *et al.*, 1994). Em estudo clínico de choque séptico, com o uso de NAC (150mg/kg EV – bolus e 50 mg/kg – infusão contínua por 4 horas) houve aumento na relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ de forma significativa, 24 horas após, quando comparada ao do grupo placebo (SPAPEN *et al.*, 1998). Esses

resultados são similares aos encontrados em nosso trabalho, onde demonstramos melhora na $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ com uso do NAC de forma preventiva.

A LPA não foi somente observada pela diminuição na capacidade de oxigenação. Alterações na mecânica respiratória são descritas na sepse. A diminuição da complacência pulmonar e o aumento da elastância, relacionadas ao colapso das pequenas vias aéreas, são peculiares aos pacientes com LPA/SDRA. O volume pulmonar encontra-se reduzido devido ao edema alveolar e a disfunção de surfactante. Essas alterações cursam com necessidade de VMI e altas pressões de insuflação (MARTIN, BERNARD, 2001). Em nosso estudo, embora não tenha sido descrito nos resultados, observamos uma diminuição da complacência nos animais controle quando comparados aos sépticos, porém sem diferença estatística ($0,53 \pm 0,06$ vs. $0,44 \pm 0,03$ mL/cmH₂O, $p=0,26$, respectivamente).

A elastância tem sido descrita como uma das melhores medidas para avaliar a LPA. A avaliação da elastância (HTIS) em nosso estudo foi significativamente menor nos animais que ingeriram NAC. Desta forma, o NAC parece exercer efeitos positivos sobre as propriedades elásticas do sistema pulmonar. Em contrapartida, Carvalho *et al.* (2006), ao estudarem camundongos submetidos à CLP e VMI (PEEP 2 cmH₂O, Vt: 0,3 mL, FR; 100 ipm), descreveram que a elastância do sistema respiratório, avaliada por um pneumotacógrafo, após 8 horas da indução da CLP, não se alterou no grupo séptico. Os autores afirmam que isto provavelmente ocorreu devido à rapidez com que os animais morreram, talvez pela produção aumentada e

descontrolada de mediadores inflamatórios que culminam em falência múltipla de órgãos.

Uma importante via de monitorização das condições pulmonares é a pressão de pico das vias aéreas. Entretanto, a medida isolada desta pressão não oferece informações adequadas sobre a presença e a magnitude de alterações pulmonares, pois, seu valor sofre grande influência da relação entre a resistência das vias aéreas (incluindo a cânula traqueal) e o fluxo inspiratório (BARBAS, 2007). O aumento na pressão de pico pode sugerir aumento na resistência das vias aéreas causada por secreção, edema e mediadores que provocam broncoespamo (MARTIN, BERNARD, 2001).

A pressão de pico em nosso estudo apresentou-se significativamente maior nos animais sépticos sem tratamento. No início da VMI, o grupo tratado com NAC apresentou níveis menores de pressão de pico, entretanto, este achado não foi observado ao final de 120 minutos de VMI. Alteração na pressão de pico tem sido descrita em animais com CLP quando se utiliza V_t alto – 35 ml/kg, entretanto, o uso de V_t baixo – 9 ml/kg parece não afetá-la. (NIN *et al.*, 2009). A diminuição da pressão de pico também foi observada em um modelo de LPA por isquemia-reperfusão quando NAC foi administrado por via venosa (INCI *et al.*, 2007).

Alterações na pressão de pico podem representar aumento na RAW. A combinação de RAW alterada com anormal perfusão pulmonar contribui para dramáticas alterações na ventilação, que podem levar a uma hipoxemia clínica. A avaliação da RAW, em nosso estudo, foi significativamente maior nos animais

sépticos do que no grupo controle. Nos animais com sepse+NAC ocorreu redução significativa neste parâmetro quando comparado ao grupo séptico não tratado.

A presença de edema pulmonar também pode causar alterações na mecânica respiratória. Pacientes com sepse demonstram variáveis graus de permeabilidade capilar, aumentando a pressão hidrostática relativa à pressão oncótica resultando em acúmulo de edema no espaço alveolar (MARTIN, BERNARD, 2001). Importante edema pulmonar foi observado, em nosso estudo, nos animais sépticos sem NAC. Interessante notar que, os animais que ingeriram NAC apresentaram índice de edema menor comparado ao grupo com sepse sem tratamento. O índice de edema foi avaliado pela histologia pulmonar, através da medida do cuffing perivascular, que indica o acúmulo de células, exsudato, numa densa massa ao redor do vaso. Os efeitos do NAC na diminuição do edema foram mostrados recentemente na LPA (XU *et al*, 2011). Em nosso estudo, a diminuição do edema pulmonar nos animais sépticos+NAC pode refletir diretamente na melhora das medidas de mecânica pulmonar, mencionadas nos animais com NAC, além de ter melhorado a relação PaO_2/FiO_2 .

Entretanto, o mecanismo para a formação de edema alveolar não se restringe somente a alteração de permeabilidade. Pode haver alterações nos co-transportadores de sódio e água no pulmão que levam a uma redução no fluido de clearance alveolar facilitando a formação de edema. (ANDRADE *et al.*, 2007).

O mecanismo mais importante associado à diminuição do clearance alveolar é a alteração no transporte de íons e os mecanismos podem ser múltiplos (BERTHIAUME *et al.*, 2002).

Para avaliar a participação dos co-transportadores de sódio na formação do edema pulmonar foram estudados o NKCC1 e ENaC. Observamos importante alteração na expressão do α -ENaC nos animais com sepse sem NAC. A diminuição na atividade do ENaC, aumenta a suscetibilidade ao edema pulmonar. Isto foi verificado por Hummler; Planès (2010), através de culturas celulares de traquéia de animais com mutação para o ENaC. Estas células foram expostas à hipoxemia, uma condição comum na insuficiência respiratória, podendo alterar o influxo de sódio e causar prejuízo para o clearance de fluido alveolar e, conseqüente, piora na resolução do edema. Em nosso estudo, o uso de NAC no grupo séptico aumentou significativamente a expressão desta proteína no pulmão, podendo refletir em menor formação de edema.

A inativação da subunidade α do canal ENaC demonstrou claramente seu papel crucial no clearance de fluido alveolar no tecido pulmonar. Ratos deficientes para esse gene apresentaram desnutrição, retrações costais e cianose, poucos minutos após o nascimento. Após 40 horas do nascimento, ocorreu morte destes animais e, na avaliação pulmonar após óbito, observou-se intensa quantidade de líquido no pulmão, demonstrando a importância da subunidade alfa no clearance de líquido pulmonar (HUMMLER *et al.*, 1996).

Outro co-transportador regulador de volume celular, o NKCC1, foi avaliado neste estudo e, embora no grupo sepse+NAC sua expressão tenha

sido encontrada diminuída, não houve diferença estatística quando comparada aos do grupo sem tratamento. A deficiência de NKCC1, nos casos de LPA, apresenta efeito protetor no desenvolvimento de bacteremia e sepse quando comparado aos animais com expressão desta proteína. Além disso, a deficiência de NKCC1 diminui os níveis de IL-10, quando comparados aos do grupo controle. Ocorre diminuição na formação de edema evidenciada pela menor relação peso úmido/peso seco e por menor vazamento capilar nos animais sem expressão de NKCC1, avaliado pela técnica de *Evan's Blue* (NGUYEN *et al.*, 2007).

Esse mecanismo de proteção causada pela deficiência de NKCC1 não é totalmente compreendido. Entretanto, Matthay e Su (2007), descreveram que durante a pneumonia e a inflamação aguda induzida por LPS, o NKCC1 nas células endoteliais e epiteliais, podem ser ativados pelas endotoxinas e citocinas inflamatórias. Assim, o NKCC1 aumenta o influxo de sódio para as células endoteliais e epiteliais podendo induzir edema. Por outro lado, a falta de NKCC1 pode reduzir a entrada de sódio e água para as células pulmonares, assim mantendo seu formato normal, facilitando a migração de neutrófilo sem alterar a permeabilidade vascular ou epitelial.

O NAC apresentou papel fundamental neste estudo, regulando a expressão protéica dos co-transportadores de sódio no epitélio alveolar e contribuindo para diminuição do edema pulmonar. Isto pode ser constatado pelo aumento na expressão do ENaC e pela deficiência da expressão do NKCC1, que contribuíram para a diminuição do índice de edema pulmonar melhorando a

mecânica pulmonar, discutido anteriormente. Contudo, os mecanismos pelos quais o NAC age, ainda não são bem elucidados. Neste estudo, podemos justificar a ação benéfica do NAC devido à diminuição do estresse oxidativo e consequentemente na inflamação.

Alguns pesquisadores como Kao *et al.* (2006) descreveram que o NAC amenizou a lesão orgânica induzida pela endotoxemia (via LPS) devido a redução na liberação de citocinas próinflamatórias e radicais livres.

Acredita-se que o estresse oxidativo seja um importante mediador de lesão celular contribuindo para o desenvolvimento da sepse. As ROS causam lesão celular endotelial, formação de fatores quimiotáticos, recrutamento de neutrófilos, peroxidação lipídica e liberação de TNF. NA SDRA, foi demonstrado diminuição dos níveis de glutathione causando lesão funcional e morfológica no trato respiratório baixo, incluindo reação inflamatória e epitelial assim como lesão endotelial resultando em edema pulmonar (DOMENIGHETTI *et al.*, 1997). Suter *et al.* (1994), relataram que as ROS aumentaram a permeabilidade vascular em pulmões isolados, *in vivo*, e em células endoteliais.

Neste trabalho, utilizamos como marcador de estresse oxidativo, o TBARS plasmático. Através dessa medida, observamos elevado nível de estresse oxidativo nos animais sépticos sem NAC. Estes achados são semelhantes aos encontrados na literatura, na qual se relata um aumento do TBARS nos animais sépticos comparado aos controles (RODRIGUEZ *et al.*, 2009;) e este aumento já pode ser mensurado de forma significativa após 3

horas da CLP (RITTER *et al.*, 2003). O TBARS aumenta não somente no plasma como também no próprio tecido pulmonar (OZDULGER *et al.*, 2003).

Na sepse, o uso de antioxidantes pode melhorar o estresse oxidativo e a lesão em múltiplos órgãos. (RITTER *et al.*, 2003). No modelo de CLP realizado no presente estudo, o NAC reduziu de forma significativa os níveis de estresse oxidativo nos animais sépticos. Além disso, é descrito que o NAC restaura os níveis de glutathione nos animais com sepse (GÜRER *et al.*, 2009). Assim, a utilização de NAC representa uma alternativa atrativa para a prevenção e tratamento de alterações causadas pelo estresse oxidativo.

O estímulo inflamatório na sepse é de tal magnitude que a capacidade microbida das células inflamatórias migradas para o foco da lesão é suprimida pela alta produção de óxido nítrico, um conhecido vasodilatador. O óxido nítrico, em primeira instância é considerado benéfico, mas a partir do momento em que há superprodução do óxido nítrico em resposta à inflamação, este passa a inibir a atividade microbida das células inflamatórias, principalmente os neutrófilos (CARVALHO *et al.*, 2006). Em nosso estudo, avaliamos a inflamação pulmonar através da contagem dos polimorfonucleares. Observamos que os animais sépticos tinham maior inflamação pulmonar comparado aos do grupo controle ($p=0,01$). O uso do NAC diminuiu a inflamação na sepse, contudo, sem significância estatística. Os neutrófilos são células capazes de realizar fagocitação e eliminar bactérias. Recentemente, foi demonstrado que o pré-tratamento com NAC (150 ml/kg) em ratos com LPA foi eficiente para reduzir os neutrófilos polimorfonucleares (XU *et al.*, 2011).

A gasometria arterial é uma importante medida para avaliar o distúrbio ácido-básico. Um parâmetro gasométrico analisado foi o pH. Esta variável encontrava-se menor (acidose) no grupo com sepse sem NAC comparado ao controle. Este resultado foi confirmado por Brégeon *et al.* (2005), que descreveram diminuição do pH após 1 hora da administração de LPS. A alteração no pH pode relacionar-se ao aumento de lactato, observado nos animais sépticos sem NAC.

O lactato sérico é um importante marcador de piora na perfusão tecidual na sepse e tem íntima relação com a mortalidade. Em nosso estudo, após 24 horas de CLP, observamos que os animais não tratados apresentaram níveis de lactato significativamente maior quando comparado ao controle. Nos animais sépticos, o NAC conseguiu normalizar os níveis de lactato arterial. No final de duas horas de VMI, o aumento de lactato persistiu no grupo séptico sem tratamento, enquanto que, no grupo tratado foi similar ao controle. O aumento de lactato tem sido descrito nos modelos de sepse e aumentam proporcionalmente com o tempo de CLP (AZEVEDO *et al.*, 2007; BRANDT *et al.*, 2009). A hiperlactatemia associada à acidose metabólica sugere que o lactato reflete a hipóxia tecidual (DE BACKER, 2003).

Em condições sépticas, os mediadores inflamatórios aceleram a glicólise aeróbia, aumentando a disponibilidade do piruvato para maior produção de lactato, mesmo na presença de grande quantidade de oxigênio. Na CLP, a desidrogenase piruvato, enzima essencial para a incorporação do piruvato no ciclo de Kreb's, está inibida, podendo induzir a hipóxia tecidual. Contudo,

mecanismos que não sejam de origem hipóxica também podem explicar a hiperlactatemia na sepse. Isto foi demonstrado por Haji-Michael *et al* (1998) que descreveram, após a exposição à endotoxina *in vitro* sem condição hipóxica, produção de lactato sanguíneo aumentada, devido a maior atividade das células sanguíneas brancas, visto que somente 10% da produção de ATP destas células provém de origem mitocondrial. Assim, grandes quantidades de lactato podem ser produzidas em processo inflamatório mesmo na falta de hipóxia tecidual.

A diminuição do lactato arterial observado nos animais com NAC em nosso estudo, pode ter sido consequência da diminuição do estresse oxidativo e da inflamação e/ou menor lesão pulmonar aguda apresentada por esses animais. Em modelo de LPS, a administração de NAC (150mg/kg) em cães ventilados, aumentou a disponibilidade de oxigênio aos tecidos e isto foi associado à diminuição na liberação do TNF (BAKKER *et al.* , 1994).

A sepse também induz a alterações hemodinâmicas que estão relacionadas à formação de óxido nítrico, um potente vasodilatador. Em nosso estudo, observamos que os animais sépticos sem NAC, encontravam-se mais hipotensos que os animais controle e sépticos com NAC, tanto no início quanto no final da VMI. A presença da hipotensão associada à taquicardia foi descrita em modelos de LPS. Entretanto, a PAM foi recuperada gradualmente após 6 horas da LPS (KAO *et al.*, 2006).

Na sepse, a hipotensão pode ser causada por uma combinação de hipovolemia secundária à perda de fluido, vasodilatação e perda do tônus

vascular normal. Os fatores que favorecerem a hipotensão são: excesso de produção de óxido nítrico, mudanças nos níveis hormonais (cortisol, vasopressina) e uso de pressão positiva (ABRAHAM; SINGER, 2007).

No nosso trabalho, a PAM esteve próxima aos níveis de normalidade nos animais tratados com NAC. Desta forma, o NAC pode ser útil na manutenção de valores de normotensão. Kao *et al* (2006), descreveram que este efeito do NAC na pressão arterial pode ser explicada pela redução na formação de óxido nítrico. Assim o NAC não se destaca somente como um antioxidante, mas como um auxiliar na redução de NO.

A sepse e o choque séptico permanecem a causa mais importante de insuficiência renal aguda nos pacientes criticamente doentes, perfazendo mais de 50% dos casos (WAN *et al.*, 2008), isto se deve à fisiopatologia da IRA séptica ser complexa e multifatorial (WHITE *et al.*, 2011).

A CLP causa um aumento tempo-dependente nos marcadores de disfunção renal (MIYAHARA *et al.*, 2003). Um dos marcadores utilizados é a creatinina, entretanto, sua alteração ocorre numa fase mais tardia da sepse (12 horas após a CLP). Provavelmente este fato seja devido à diluição da creatinina com o volume de expansão dado com 6 horas após a CLP. Desta forma, a creatinina em fases iniciais da sepse não pode traduzir a severidade da disfunção renal. Por este motivo, em nosso estudo, o marcador de função renal foi o clearance de inulina.

A avaliação da taxa de filtração glomerular no presente estudo apresentou duas finalidades: 1-avaliar os efeitos da sepse e do NAC na função

renal e 2- avaliar se a VMI causa alteração da filtração renal. Assim, essa medida foi feita em animais em ventilação espontânea e em VMI.

O uso da VMI, principalmente a PEEP, pode causar muitas alterações, como diminuição do retorno venoso, na pré-carga cardíaca e na filtração glomerular (RICCI e RONCO, 2010). Em nosso estudo, não observamos diferença significativa na filtração glomerular, avaliada pelo clearance de inulina, entre os animais sépticos em VMI quando comparados aos sépticos em ventilação espontânea. Desta forma, a VMI por duas horas, não causou grandes impactos na taxa de filtração glomerular. Isto deve ter sido causado pela utilização de baixo volume corrente (8 ml/kg) e PEEP de 6 cmH₂O. Esta modalidade ventilatória com baixo volume corrente, amplamente divulgado na década de 90, demonstrou que a limitação de volume e o uso de PEEP maior, aumentaram a sobrevida e melhorou parâmetros clínicos nos pacientes com SDRA (AMATO *et al.*, 1998; BROCHARD *et al.*, 1998).

Por outro lado, a sepse causou IRA tanto nos animais ventilados mecanicamente quanto em ventilação espontânea quando comparado aos controles. A diminuição da taxa de filtração glomerular pode ser explicada por diferenças na pressão glomerular capilar gerada pelos vasos renais aferentes e eferentes. Essa desproporção aumenta a vasodilatação renal nos vasos eferentes comparado com os aferentes. Isto causa redução na pressão capilar glomerular levando a diminuição da filtração glomerular causando oligúria e redução no clearance de solutos (WHITE *et al.*, 2011). A utilização do NAC nos

animais reverteu a IRA causada pela sepse, provavelmente por sua ação antioxidante.

Acreditava-se que a IRA séptica ocorria devido a uma condição hemodinâmica causada por baixo fluxo renal (JOANNES-BOYAN *et al.*, 2009) que poderia causar deterioração metabólica e morte celular, provocando a IRA (BELLOMO, 2008). No sistema renal, a vasoconstrição das arteríolas aferentes diminui a perfusão glomerular. Através da microperfusão foi demonstrado que a endotoxina diminuiu a filtração e fluxo glomerular com aumento na resistência arteriolar renal (KLENZAK *et al.*, 2005). Por outro lado, existem artigos que relatam que o fluxo renal pode estar normal ou eventualmente aumentado no choque séptico (WAN *et al.*, 2008). Brenner *et al.*, (1990) demonstraram que a disfunção renal induzida pela sepse ocorreu na presença de fluxo sanguíneo renal normal.

Existem muitas controvérsias a respeito do fluxo renal na IRA induzida pela sepse. Estudos experimentais mostram resultados diferentes em termos de perfusão renal, em parte devido ao modelo animal, incluindo tipo de animal e tipo de insulto, diferentes métodos de medida e o mais importante, o estado da circulação sistêmica em que o animal se encontra (BELLOMO *et al.*, 2008).

Neste trabalho, o fluxo sanguíneo renal diminuiu de forma significativa no grupo séptico quando comparado ao grupo controle, assim como os animais com NAC. Devido à intensa peritonite causada pelo modelo de CLP, o acesso para a artéria renal ficou prejudicado. Além disso, embora o *probe* fosse

adequado para mensurar o fluxo renal em ratos, muitas vezes o sinal apresentou-se baixo.

Avaliamos o sódio e potássio plasmático e não encontramos alterações importantes nos animais sépticos quando comparados aos do grupo controle. O mesmo descreveu Olesen *et al.* (2009), que também não observaram alterações importantes nos animais com sepse induzidos por LPS.

A mortalidade nos modelos de sepse já está bem estabelecida pela literatura. É sabido que nos modelos experimentais de sepse, a mortalidade é muito elevada. Um fator que interfere diretamente na taxa de mortalidade é o suporte pós - CLP. Animais com sepse, modelo de CLP, que receberam a associação de antibiótico e reposição volêmica obtiveram sobrevivência de 100% em 24 horas, 43% em 48 horas e 14% em 72 horas (MIYAHARA *et al.*, 2003).

No nosso estudo também utilizamos antibiótico (Imipenem e Cilastatina) e soro fisiológico 6 horas após a CLP e a cada 12 horas. A taxa de sobrevivência em 72 horas no grupo controle foi de 100% e 24% nos sépticos sem NAC. Esses dados são parecidos com os estudos de Yasuda *et al.* (2006), no qual a sobrevivência em camundongos, que receberam suporte pós CLP foi de 26% em 72 horas.

O NAC em nosso estudo contribuiu para a diminuição da mortalidade. Obtivemos valores mais expressivos para a melhora na sobrevivência nos animais com sepse tratados com NAC (67%) quando comparados aos sépticos sem NAC (24%) em 72 horas de acompanhamento. Os efeitos do NAC foram avaliados na mortalidade em animais sépticos por Kao *et al.* (2006), que

descreveram, em modelo de LPS, diminuição da mortalidade dos animais sépticos tratados com NAC, quando comparados aos animais não tratados (23% vs. 43%, respectivamente, $p < 0,01$).

A avaliação da mortalidade ainda permanece como padrão ouro para avaliar novas propostas terapêuticas na sepse. Isto porque a mortalidade na sepse aumenta de maneira expressiva quando está associada à IRA e outras disfunções orgânicas. (DOI *et al.*, 2009).

A melhora na mecânica respiratória, a diminuição do edema pulmonar, menores níveis de estresse oxidativo e melhora na insuficiência renal, podem explicar a melhora na sobrevida de animais sépticos tratados com NAC.

No nosso estudo, podemos observar pelas características clínicas, que o modelo de CLP, reproduziu uma sepse severa. Isto foi observado pelos níveis de lactato arterial, maiores que 2 mmol/L, presença de acidose metabólica, hipotensão arterial, alteração de mecânica respiratória, e perda de mais de 40% da função renal em 24 horas após o modelo. A ventilação mecânica é uma terapêutica que tem por finalidade melhorar trocas gasosas e manter adequado fornecimento de oxigênio aos tecidos na presença de insuficiência respiratória secundária a sepse, entretanto, pelo uso da pressão positiva, que é anti-fisiológica, pode ter um agravamento do quadro clínico da sepse. Contudo, conseguimos estabelecer que o uso de NAC (via oral) de forma preventiva, administrado dois dias antes do modelo experimental de sepse, causou efeitos surpreendentes na melhora do lactato arterial, na incapacidade de oxigenação, nas medidas de mecânica respiratória e na capacidade de prevenir a

insuficiência renal aguda, mesmo com o uso da ventilação mecânica. Com base nesses dados, o uso do NAC torna-se promissor para minimizar as alterações pulmonares e renais associadas à sepse.

7.0 CONCLUSÕES

O modelo experimental de sepse, CLP, causou importantes alterações tanto na função pulmonar quanto na renal.

Surpreendentemente, a utilização preventiva de um antioxidante, o NAC, melhorou a mecânica respiratória e diminuiu edema pulmonar provavelmente pelo aumento na expressão do canal ENaC. No sistema renal, o NAC preveniu o desenvolvimento da insuficiência renal aguda, um achado comum nos pacientes sépticos.

A diminuição do estresse oxidativo proporcionada pelo NAC, talvez seja o mecanismo predominante neste estudo, para essa potencial melhora nos parâmetros pulmonares e renais em animais com sepse.

8.0 REFERÊNCIAS

- 1- ABRAHAM E; SINGER M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Crit Care Med** 2007; 35(10):2408-2416.

- 2- ALLEN G; BATES JH. Dynamic mechanical consequences of deep inflation in mice depend on type and degree of lung injury. **J. Appl. Physiol.** 2004; 96:293-300.

- 3- ANNAT G; VIALE JB; XUI XB; *et al.* Effects of PEEP ventilation on renal function, plasma renin, aldosterone, neurophysins and urinary ADH and prostaglandins. **Anesthesiology** 1983; 58: 136-141.

- 4- AMATO MB; BARBAS CS; MEDEIROS DM; *et al.* Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med** 1998; 338(6):347-54.

- 5- ANDRADE L; RODRIGUES JAC; SANCHES TRC; *et al.* Leptospirosis leads to desregulation of sodium transporters in kidney and lung. **Am J Physiol Renal Physiol** 2007; 292: 586-592.

6- ANDONEGUI G; BONDER CS; GREEN F; *et al.* Endothelium derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. **J Clin Invest** 2003; 111:1011-1020.

7- ARMSTRONG L; MEDFORD AR; HUNTER KJ; *et al.* Differential expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR 4 on monocytes in human sepsis. **Clin Exp Immunol** 2004; 136:312-319.

8- ARUOMA OI; HALLIWELL B; HOEY BM; BUTLER J. - The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radic. Biol. Med.** 1989; 6: 593-597.

9- AYALA A; CHUNG CS; LOMAS JL; *et al.* Shock-Induced Neutrophil Mediated Priming for Acute Lung Injury in Mice: Divergent Effects of TLR-4 and TLR-4/FasL Deficiency. **Am J Pathol.** 2002;161(6):2283-94.

10- AZEVEDO LCP; PARK M; NORITOMI DT; *et al.* characterization of an animal model of severe sepsis associated with respiratory dysfunction. **Clinics** 2007; 62(4):491-498.

11- BAKKER J; ZHANG H; DEPIERREUX M. Effects of N-acetylcysteine in endotoxic shock. **J Crit Care** 1994; 9(4):236-43.

12- BARBAS CSV. III Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. **J Bras Pneum** 2007; 33 (supl 2) S106-S110.

13 – BATES JHT. Pulmonary mechanics: a system identification perspective. **31st Annual International Conference of the IEEE EMBS** Minneapolis, Minnesota, USA, September 2-6; 2009

14- BATES JHT; ALLEN GB. The estimation of lung mechanics parameters in the presence of pathology: a theoretical analysis. **Annals of Biomedical Engineering** 2006; 34(3):384-392.

15- BELLOMO R; WAN LI; LANGENBERG C; *et al.* Septic acute kidney injury: new concepts. **Nephron Exp Nephrol** 2008; 109: e95-e100.

16- BERNARD GR; ARTIGAS A; BRIGHAM KL; *et al.* The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med** 1994; 148:818.

17- BERTHIAUME I; FOLKESSON HG; MATTHAY MA. Lung edema clearance: 20 years of progress invited review: alveolar edema fluid clearance in the injured lung. **J Appl Physiol** 2002; 93:2207-221.

18- BOUCHARD J; SOROKO SB; CHERTOW GM; *et al.* Program to improve care in acute renal disease (PICARDI) study group. Fluid accumulation, survival and recovery of kidney function in critically ill patients with acute kidney injury. **Kidney Int** 2009; 76:422-427.

19- BRANDT S; REGUEIRA T; BRACHT H; *et al.* Effect of fluid resuscitation on mortality and organ function in experimental sepsis models. **Crit Care** 2009; 13(6):R186.

20- BREGÉON F; DELPIERRE S; CHETAILLE B; *et al.* Mechanical ventilation affects lung function and cytokine production in an experimental model of endotoxemia. **Anesthesiology** 2005; 102: 331-339.

21- BRENNER M; SCHAER GL; MALLORY DL; *et al.* Detection of renal blood flow abnormalities in septic and critically ill patients using a newly designed indwelling thermodilution renal vein catheter. **Chest** 1990; 98:170-179.

22- BROCHARD L; ROUDOT-THORAVALL F; ROUPIE E; *et al.* Tidal volume reduction for prevention of ventilator-induced lung injury in acute respiratory distress syndrome. The Multicenter Trial Group on Tidal Volume reduction in ARDS. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 158(6):1831-8.

- 23- CARVALHO RS; PINHO AGM; ANDRADE APA; *et al.* Análise da mecânica pulmonar em modelo experimental de sepse. **J Bras Pneumol** 2006; 32(4): 316-321.
- 24- CASTIELLO A; PATERSON IF; SHELLEY SA; *et al.* Depletion of surfactant tubular myelin with pulmonary dysfunction in a rat model for acute endotoxemia. **Shock** 1994; 2(6):427-32.
- 25- CHERTOW GM; LAZARUS JM; PAGANINI EP; *et al.* Predictors of mortality and the provision of dialysis in patients with acute tubular necrosis. The Auriculin Anaritide Acute Renal Failure Study Group. **J Am Soc Nephrol** 1998; 9(4):692-698.
- 26- COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature** 2002; 420(19): 885-891.
- 27- CUNNINGHAM PN; DYANOV; PARK P; *et al.* Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. **J Immunol** 2002; 168:5817-5823.
- 28- DE BECKER D. Lactic acidosis. **Minerva Anesthesiol** 2003; 69:281-284.

29- DRAGER LF; ANDRADE L; TOLEDO JFB; LAURINDO FRM; CESAR LA M; SEGURO AC. Renal effects of N-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress mediated renal tubular injury. **Nephrol Dial Transplant.** 2004; 4: 1-5.

30- DOI K; LEELAHAVANICHKUL A; YEN STP; STAR RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation** 2009; 119 (10): 2868-2878.

31- DOMENIGHETTI G; SUTER PM; SCHALLER MD; *et al.* Treatment with N-acetylcysteine during acute respiratory distress syndrome: a randomized, double-blind, placebo- controlled clinical study. **Journal of Critical Care** 1997; 12(4):177-182

32- LEFF JA; WILKE CP; HYBERTSON BM; *et al.* Postinsult treatment with N-acetyl-L-cysteine decreases IL-1 induced neutrophil influx and lung leak in rats. **Am J Physiol** 1993; 265: L501-506.

33- GATTINONI L; SIBILLA S; TRIDIA S; *et al.* Equal increases in respiratory system elastance reflect similar lung damage in experimental ventilation induced lung injury. **Intensive Care Med** 2002; 28: 196-203.

- 34- GOMES RFM; SHEN X; RAMCHANDONI R; *et al.* Comparative respiratory system mechanics in rodents. **J Appl Physiol** 2000; 89: 908-916.
- 35- GUARRILDO AG; FIGUEIREDO LFP; SILVA MR. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cirurgica Brasileira**, 19(2), 2004.
- 36- GÜRER A; ÖZDOĞAN M; GÖKAKIN AL; *et al.* Tissue oxidative stress 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.** 2009; 15(1): 1-6.
- 37- HAJI-MICHAEL PG; LADRIERE L; SENER A. Leukocyte glycolysis and lactate output in animal sepsis and ex vivo human blood. **Metabolism** 1998; 48:779-85.
- 38- HIRAI T; MCKEOWN KA; GOMES RFM; BATES JHJ. Effects of lung volume on lung and chest wall mechanics in rats. **J Appl Physiol** 1999; 86: 16-21.
- 39- HUMMLER E; BARKER P; GATZY J; *et al.* Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. **Nat Genet** 1996; 12:325- 328.

40- HUMMLER E; PLANÈS C. Importance of ENaC-Mediated sodium transport in alveolar fluid clearance using genetically-engineered mice. **Cell Physiol Biochem** 2010; 25: 63-70.

41- INCI I; ZHAI W; ARNI S; *et al.* N-Acetylcysteine attenuates lung ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. **Ann Thorac Surg** 2007; 84:240-246.

42- IONESCU C; DEROM E; KEYSER R. Assessment of respiratory mechanical properties with constant-phase models in healthy and COPD lungs. **Computer methods and programs in biomedicine** 2010; 97:78-95.

43- JOANNES-BOYAN O; HONORÉ PM; BOER W; *et al.* Septic acute kidney injury and tubular apoptosis: never a Lone Ranger. **Intensive Care Med** 2009; 134:1725-8.

44- KAO SJ; WANG D; LIN HI; *et al.* N-Acetylcysteine abrogates acute lung injury induced by endotoxin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 2006; 33:33-40.

45- KLENZAK J; HIMMELFARB J. Sepsis and Kidney. **Crit Care Clin** 2005; 21: 211-222.

46- KNOTEK M; ROGACHEV B; WANG W; *et al.* Endotoxemic renal failure in mice: role of tumor necrosis factor independent of inducible nitric oxide synthase. **Kidney Int.** 2001; 59: 2243-2247.

47- MAJUMDAR A. Sepsis-induced acute kidney injury (*abstract*). **Indian Journal of Critical Care Med** 2010; 14(1): 14-21.

48- MARTIN GS; BERNARD GR. Airway and lung in sepsis. **Intensive Care Med** 2001; 27: S63-S79.

49- MATTHAY MA; SU X. Pulmonary barriers to pneumonia and sepsis. **Nature medicine** 2007; 13(7):780-781.

50- MIYAJI T; HU X; YUEN PST; *et al.* Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice. **Kidney International** 2003; 64:1620-1631.

51- MORA ASPR; LUTCHEN KR; INEGENITO EP; *et al.* Variable tidal volume ventilation improves lung mechanics and gas Exchange in a rodent model of acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2002; 165:366-371.

52- NIN N; LORENTE JA; FERNÁNDEZ-SEGOVIANO P; *et al.* High-tidal volume ventilation aggravates sepsis-induced multiorgan dysfunction in a dexamethasone-inhibitable manner. **Shock** 2009; 31(4):429-434.

53- NGUYEN QT; JU SA; PARK SM; *et al.* Blockade of CD137 counteracts polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Infec. Immun.** 2009; 77(9): 3932-3938.

54- NGUYEN M; PACE AJ; KOLLEN BH. Mice lacking NKCC1 are protected from development of bacteremia and hypothermic sepsis secondary to bacterial pneumoniae. **J. Exp. Med.** 2007; 204(6):1383-1393.

55- OHKAWA H; OHISHI N; YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem** 1979; 95:351-358.

56- OLESEN ETB; DE SEIGNEUX S; WANG G; *et al.* Rapid and segmental specific dysregulation of AQP2, S256-pAQP2 and renal sodium transporters in rats with LPS-induced endotoxaemia. **Nephron Dial Transplant** 2009; 24:2338-2349.

57- OLIVEIRA WRS de; CAVASSANI SS; MAGANHIN CC; *et al.* Aspectos histomorfológicos e respiratórios em modelo de lesão pulmonar aguda por

sepsis em ratos tratados com pentoxifilina. **Rev Assoc Med Bras** 2009; 55(2):127-31.

58- ORTALANI O; CONTI A; GAUDIO AR; *et al.* The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. **Am J Respir Crit Care Med** 2000; 161:1907-1911.

59- OZDULGER A; CINEL I; KOKSEL O. The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture induced sepsis model. **Shock** 2003; 19(4): 366-372.

60- PARKER JC; HERNANDEZ LA; PEEVY KJ. Mechanism of ventilator-induced lung injury. **Crit Care Med** 1993; 21: 131- 43.

61- PARKER JC; TOWNSLEY MI. Evaluation of lung injury in rats and mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2004; 286:L231-L246.

62- PATRICK D; WALKER S; SUDHIR V. Reactive oxygen metabolites in endotoxin-induced acute renal failure in rats. **Kidney International** 1990; 38:1125-1132.

63- RABB H; WANG Z; NEMOTO T; HOTCHKISS J; YOKOTA N; SOLEIMANI M. Acute renal failure leads dysregulation of lung salt and water channels. **Kidney International** 2004; 63: 600-606.

64- RANIERI VM; GIUNTA F; SUTER PM; SLUTSKY AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. **JAMA** 2000; 284(1):43-4.

65- REMICK DG; NEWCOMB DE; BOLGOS GL; *et al.* Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock** 2000; 13:110-116.

66- RICCI Z; RONCO C. Pulmonary/renal interaction. **Current Opinion in Critical Care** 2010; 16: 01-06.

67- RITTER C; ANDRADES ME; REINKE A; *et al.* Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Crit Care Med** 2004; 32:342-349.

68- RITTER C; ANDRADES M; FROTA MLC; *et al.* Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. **Intensive Care Med** 2003; 29:1782-1789.

69- RIVERS E; NGUYEN B; HAVSTAD S; *et al.* Early goal directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med.** 2001; 345:1368-1377.

70- RODRIGO R; TRUJILLO S; BOSCO C. biochemical and ultrastructural lung damage induced by rhabdomyolysis in the rat. **Exp. Biol Med** 2006; 231: 1430-1438.

71- RODRIGUEZ ZZ; GUANCHE D; ÁLVAREZ RG; *et al.* Preconditioning with ozone/oxygen mixture induces reversion of some indicators of oxidative stress and prevents organic damage in rats with fecal peritonitis. **Inflamm. Res.** 2009; 58: 371-375.

72- SHUESSLER TF; BATES JHT. A computer-controlled research ventilator for a small animals: design and evaluation. **IEEE Trans. Biomed. Eng.** 1995; 42:860-866.

73- SHIMIZU MH; DANILOVIC A, ANDRADE L; *et al.* N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. **Nephrology Dialysis Transplantation** 2008; 23(10): 3067-73.

74- SIBILLA S; TREDICI S; PORRO A; *et al.* Equal increases in respiratory system elastance reflect similar lung damage in experimental ventilator-induced lung injury. **Intensive Care Med** 2002; 28(2):196-203.

75- SILVA PL; CRUZ FF; FUJISAKI LC; *et al.* Hypervolemia induces and potentiates lung damage after recruitment maneuver in a model of sepsis-induced acute lung injury. **Critical Care** 2010; 14:1-16.

76- SUTER P; DOMENIGHETTI G; SCHALLER MD, *et al.* N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. **Chest** 1994; 105:190-194.

77- SPAPEN H; ZHANG H; DEMANET C; *et al.* Does N-acetyl-L-Cysteine influence cytokine response during early human sepsis. **Shock** 1998; 113: 1616-1624.

78- THADHANI R; PASCUAL M; BONVENTRE JV. Acute renal failure. **N Engl J Med** 1996; 334(22):1448-60.

79- TEPEL M. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. **N Engl J Med.** 2000; 343(3):180-184.

80- TOBIN MJ. Principles and practice of mechanical ventilation. USA; **Editora McGraw-Hill**, 1994.

81- TSUJIMOTO H; ONO S; MAJIMA T; *et al.* Neutrophil elastase, MIP-2 and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. **Shock** 2005; 23:39-44.

82- VALENZA F; SIBILLA S; PORRO GA; *et al.* An improved in vivo rat models for the study of mechanical ventilatory support effects on organ distant to the lung. **Crit Care Med** 2000; 28: 3697-3704.

83- VIEIRA RP; DUARTE ACS; CLAUDINO RC; *et al.* Creatine Supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2007; 37: 660-667.

84- VINCENT JL. Clinical sepsis and septic shock – definition, diagnosis and management principles. **Langenbecks Arch Surg** 2008; 393:817-824.

85- WAN L; BAGSHAW SM; LANGENBERG C; *et al.* Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know? **Crit Care Med** 2008; 36(4): S198-S203.

86- WANG H. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice (*abstract*).
Science 1999; 285: 248-251.

87- WHITE LE; CHAUDHARY R; MOORE LJ; *et al.* Surgical sepsis and organ crosstalk: the role of the kidney. **Journal of Surgical Research**. Article in press. 2011.

88- XU JF; QU JM, LI HP. N-acetylcysteine modulates acute lung injury induced by *Pseudomonas aeruginosa* in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. Article in press. 2011.

89- YASUDA H; YUEN PST; HU X; *et al.* Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. **Kidney International** 2006; 69(9): 1535-1542.

90- ZAFARULLAH M; LI WQ; SYLVESTER J; AHMAD, M: Molecular mechanisms of *N*-acetylcysteine actions. **Cell. Mol. Life Sci.** 2003; 60: 6-20.

91- ZHANG H; SLUTSKY AS; VINCENT JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. **Intensive Care Med** 2000; 26:474-476.