

Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira

**INFLUÊNCIA DO AMBIENTE REDOX EM PARÂMETROS  
INFLAMATÓRIOS DA PNEUMOSEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.  
Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis - SC  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira, Filipe Rodolfo Moreira Borges de  
Influência do ambiente redox em parâmetros  
inflamatórios da pneumosepse / Filipe Rodolfo  
Moreira Borges de Oliveira ; orientador, Jamil  
Assreuy, 2019.  
95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Pneumosepse. 3. Oxidação. 4.  
Redução. 5. Sulfidrilas. I. Assreuy, Jamil. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Aos meus pais, Péricles Borges e  
Rosemary Moreira, pelo apoio  
incondicional.

À minha avó, Maria Carmen, por  
todas as orações que me levaram até  
aqui.



## AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus por sempre me mostrar seu cuidado comigo. Agradeço a Ele por todas as oportunidades e pessoas que apareceram em minha vida.

Ao meu orientador, Jamil Assreuy, por me mostrar um pouco do incrível mundo da ciência. Um cientista com pensamento crítico como poucos. Obrigado pelos ensinamentos acadêmicos, científicos e pessoais. Orgulho-me em ter sido orientado pelo senhor.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Alfeu Zanotto, Prof. Dr. José Carlos e Dr. Daniel Gasparin pelo tempo empregado para a avaliação deste trabalho por todas as contribuições.

A todas as colegas de trabalho da equipe do NOLab, entre elas: Adriane Madeira, Camila Fernandes, Clarissa Barp, Déborah Minini, Jaine Grando, Jheniffer Mattos, Maria Luísa Hahmeyer, Patrícia Benedet, Rafaela Stachewski e Thiele Rosales por todo o aprendizado e boa convivência.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFSC pelos valiosos aprendizados.

À Profa. Dra. Deborah Hizume por ter ensinado a coleta do lavado broncoalveolar que foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alcir Dafre pela ajuda no desenvolvimento e padronização do método experimental de dosagem de sulfidrilas.

À Técnica Me. Daiane Bobermin pela ajuda na manipulação da cepa da bactéria e nos experimentos de disseminação bacteriana.

À minha querida amiga Thiele Rosales pelo companheirismo. Mostrou-se uma grande amiga, tanto dentro do laboratório como fora dele. Sou muito grato por ter você como amiga. Obrigado pelas incontáveis horas de ajuda nos experimentos.

À Adriane Madeira, nossa “mãe” dentro do NOLab, que sempre nos ajuda a resolver os problemas do dia-a-dia. Você é um exemplo de humanidade.

À Camila Fernandes, à época, estudante de iniciação científica do laboratório, que me ensinou a técnica cirúrgica de indução da sepse por pneumonia.

Ao Cesar Antônio Teló, pelo companheirismo e auxílio na conferência da redação deste documento.

Aos meus colegas da turma do mestrado. Conheci pessoas incríveis nestes dois anos e pude aprender muitas coisas, tanto no âmbito profissional quanto pessoal.

À Marcella Ferreira por ser parceria certa desde o curso de inverno em que nos conhecemos.

Aos meus amados pais, Péricles Borges e Rosemary, por serem meus exemplos. Eu agradeço por todo o apoio para que eu realize meus sonhos e pelo amor incondicional.

À minha irmã, Karen, e ao meu cunhado, Rômulo, por sempre me estimularem a seguir firme, mesmo nas horas mais difíceis.

À minha tia Célia e minha prima Patrícia por serem apoio fundamental na minha caminhada. Sempre me ajudando de todas as formas possíveis. Sou muito grato por tudo que vocês já fizeram e ainda fazem.

A todos os meus avós, tios e primos por toda a esperança depositada em mim.

Aos meus amigos de longa data Cleyton, Érika, Isabelle e Tatyanne. Agradeço pelo apoio e por entenderem os momentos de ausência.

Aos funcionários do biotério da Farmacologia e do LAMEB por serem tão solícitos.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

"(...) Sensing my deep frustration about my lack of success, he asked if I knew the difference between an average scientist and a world-class one. When I said that I did not, he said something to the following effect: 'For an average scientist, perhaps 1% of experiments actually work. But for the superstar, it could be as high as 2%.' I have often passed this insight along to trainees in a talk that I give each year to research fellows at Duke entitled 'How to deal with failure and rejection in research'. I do, however, add the proviso that I have come to believe that 2% is a bit high."

Robert J. Lefkowitz





## RESUMO

Sepse é definida como uma disfunção orgânica causada por uma resposta imune desregulada frente à uma infecção e continua sendo a principal causa de morte em Unidade de Terapia Intensiva (UTIs). Muito se avançou nos últimos anos no que diz respeito ao entendimento da fisiopatologia da doença, mas ainda existem vários pontos a serem elucidados relacionados aos seus mecanismos moleculares. Sabe-se que a sepsé é uma condição grave com alteração do perfil oxidativo, com vários efeitos sobre as sulfidrilas reativas de tíóis proteicos e não proteicos e, conseqüentemente, sobre o ambiente redox do hospedeiro. Estudos mostram que a modulação do estado redox pode ter conseqüências diretas sobre a atividade das proteínas pela mudança conformacional induzida pela oxidação ou redução das sulfidrilas, ou por mudanças indiretas no estado redox, com conseqüências nos mecanismos de sinalização e transdução celulares e na transcrição gênica. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de um agente oxidante (Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) - DTNB) e um agente redutor (Ditiltreitol - DTT) de sulfidrilas sobre os parâmetros inflamatórios, bioquímicos, bacterianos e na formação de nitrosotíóis em animais submetidos à sepsé induzida por pneumonia. Para isso, camundongos *Swiss* foram tratados com DTNB e/ou DTT (ambos nas doses de 31,25, 63 ou 126  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) 12 horas após a indução da sepsé. Depois de 24 horas da indução, os animais eram eutanasiados e foram avaliados os seguintes parâmetros: permeabilidade capilar pulmonar, migração de leucócitos, dosagem de nitrato e nitrito, proteínas no lavado alveolar, disseminação bacteriana, dosagem de nitrosotíóis e mortalidade após o insulto. O DTT, no esquema de doses utilizado, não apresentou nenhum efeito nos parâmetros inflamatórios e bioquímicos. Já o DTNB diminuiu a formação de edema pulmonar, diminuiu a migração de leucócitos para o foco primário, diminuiu a produção local de óxido nítrico e a produção de exsudato. Além disso, o DTNB foi capaz de diminuir a disseminação bacteriana para outros tecidos cardiovasculares e diminuiu a formação de nitrosotíóis no parênquima pulmonar. Por fim, o DTNB diminuiu a mortalidade dos animais no tempo avaliado, mas o DTT não apresentou influência na sobrevivência. Entretanto, quando o DTT foi administrado uma hora após o DTNB, o efeito de proteção do DTNB foi revertido. Estes resultados mostram que nas doses das ferramentas farmacológicas utilizadas, a oxidação das sulfidrilas pelo DTNB melhorou o perfil inflamatório do hospedeiro e que um dos mecanismos da

modulação do sistema redox pelo DTNB é a redução dos níveis de nitrosotióis.

**Palavras-chave:** Sulfidrilas, oxidação, redução.

## ABSTRACT

Sepsis is defined as an organic dysfunction caused by a dysregulated immune response to an infection and remains the leading cause of death in the Intensive Care Units (ICUs). Much progress has been made in recent years in understanding the pathobiology of the disease, but there are still several points to be elucidated regarding its molecular mechanisms. It is known that sepsis is a serious condition with alteration of the oxidative profile, with several effects on the reactive sulfhydryls of protein and non-protein thiols, and, consequently, on the redox environment of the host. Studies have shown that modulation of the redox state may have direct consequences on the activity of proteins by conformational change induced by the oxidation or reduction of the sulfhydryl, or by indirect changes in the redox state, with consequences in the signaling and cellular transduction mechanisms and in the genetic transcription. Therefore, the objective of this work was to evaluate the influence of an oxidizing agent (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) - DTNB) and a reducing agent (dithiothreitol - DTT) of sulfhydryls on the inflammatory, biochemical, bacterial parameters, and the formation of nitrosothiols in animals submitted to pneumonia-induced sepsis. For this, Swiss mice were treated with DTNB and/or DTT (both 31.25, 63 or 126  $\mu\text{mol} / \text{kg}$ , s.c.) 12 hours after sepsis onset. Twenty-four hours after the induction, the animals were euthanized, and the following parameters were evaluated: pulmonary capillary permeability, leukocyte migration, plasma nitrate and nitrite, proteins in the alveolar lavage, bacterial spread, nitrosothiol dosage, and mortality after insult. DTT, in the dose schedule used, had no effect on inflammatory and biochemical parameters. DTNB decreased the formation of pulmonary edema, decreased leukocyte migration to the primary focus, decreased local production of nitric oxide and the production of exudate. In addition, DTNB was able to decrease bacterial spread to other cardiovascular tissues, and decreased nitrosothiol formation in the lung parenchyma. Finally, DTNB decreased animal mortality at the time evaluated, but the DTT had no influence on survival. However, when the DTT was administered one hour after the DTNB, DTNB protection was reversed. These results show that, at least in the dosage scheme of the pharmacological tools used, the oxidation of sulfhydryls by DTNB has improved the inflammatory profile of the host, and that one of the mechanisms of modulation of the redox system by DTNB is the reduction of nitrosothiol levels.

**Keywords:** Sulfhydryl, oxidation, reduction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de modificações de cisteínas reativas.....	25
Figura 2 – Aminoácidos que são alvos para oxidações reversíveis.....	26
Figura 3 – Reação de oxidação de tiol livre pelo DTNB.....	29
Figura 4 – Reação de redução de dissulfetos pelo DTT.....	30
Figura 5 – Protocolo experimental de padronização do modelo de pneumosepse.....	39
Figura 6 – Protocolo experimental de modulação do estado redox.....	37
Figura 7 – Representação esquemática do ensaio de <i>Biotin Switch</i> .....	41
Figura 8 – Curva de sobrevivência após a inoculação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em camundongos.....	43
Figura 9 – Efeito do DTNB (A) e do DTT (B) no extravasamento vascular pulmonar em camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.....	45
Figura 10 – Avaliação das células do lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> e tratados com DTNB (A) e DTT (B).....	47
Figura 11 – Dosagem de nitrito + nitrato (NOx) no lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> e tratados com DTNB (A) e DTT (B).....	49
Figura 12 – Dosagem de proteínas no lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> e tratados com DTNB (A) e DTT (B).....	51
Figura 13 – Avaliação da disseminação bacteriana no lavado broncoalveolar (A), sangue (B), fígado (C) e coração (D) de camundongos inoculados com <i>K. pneumoniae</i> .....	53
Figura 14 – Análise por fluorescência da quantidade de nitrosotióis em tecido pulmonar de animais controle ( <i>naïve</i> ) e sépticos tratados com veículo ou DTNB.....	55

Figura 15 – Efeito da modulação do estado redox através da administração de agentes oxidante e redutor de sulfidrilas na sobrevida de animais sépticos.....57

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Definições de síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sepse, sepse grave e choque séptico de acordo com o <i>Sepsis-1</i> .....	17
---	----





## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Avaliação sequencial de falência orgânica (SOFA).....	20
--	----



## LISTA DE ABREVIACOES

<b>A.E.</b>	Azul de Evans
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AP-1</b>	Proteína de ativao 1 ( <i>Activation Protein 1</i> )
<b>ATCC</b>	Coleo de cultura do tipo americana ( <i>American Type Culture Collection</i> )
<b>BAL</b>	Lavado broncoalveoar
<b>BHI</b>	Infusão Cérebro-corao ( <i>Brain-heart Infusion</i> )
<b>CEUA</b>	Comisso de tica no Uso de Animais
<b>CLR</b>	Receptor de lecitina do tipo C ( <i>C-type Lecitine Receptor1</i> )
<b>Cox-2</b>	Ciclo-oxigenase-2
<b>DTNB</b>	cido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzico)
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EGR-1</b>	Proteína de resposta de crescimento precoce 1 ( <i>Early Growth Response 1</i> )
<b>e.p.m.</b>	Erro padrão da mdia
<b>ESICM</b>	<i>European Society of Intensive Care Medicine</i>
<b>FIO<sub>2</sub></b>	Frao de Oxignio Respirado
<b>i.t.</b>	Intratraqueal

<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>NETs</b>	Redes extrcelulares de neutrófilos ( <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> )
<b>NF- κB</b>	Fator nuclear kappa B ( <i>Nuclear Factor Kappa B</i> )
<b>NMDA</b>	N-metil D-aspartato
<b>NOD</b>	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos ( <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i> )
<b>NOS-2</b>	Sintase de Óxido Nítrico-2
<b>NOx</b>	Nitrito + Nitrato
<b>NPSH</b>	SH proteico ( <i>Non-proteic SH</i> )
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Pressão Parcial de Oxigênio
<b>PAM</b>	Pressão Arterial Média
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados a patógenos ( <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
<b>PBS</b>	Tampão salina fosfatado ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PRRs</b>	Receptores de reconhecimento padrão ( <i>Pattern Recognition Receptors</i> )
<b>PSH</b>	SH proteico ( <i>Proteic SH</i> )
<b>r.p.m.</b>	Rotações por minuto

<b>RIG-1</b>	Gene indutível pelo ácido retinoico ( <i>Retinoic Acid-inducible Gene</i> )
<b>s.c.</b>	Subcutânea
<b>SCCM</b>	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SOFA</b>	Avaliação sequencial de disfunção orgânica ( <i>Sequential Organ Failure Assessment</i> )
<b>SNO</b>	S-nitrosotiol
<b>SIRS</b>	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
<b>STAT-1</b>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 ( <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i> )
<b>TNB</b>	Ácido 2-nitro-5-tiobenzóico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> )
<b>TRL</b>	Receptor tipo Toll ( <i>Toll-Like Receptor</i> )
<b>U.A.</b>	Unidades Arbitrárias
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva

**OBS:** as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 SEPSE.....	23
<b>1.1.1 Epidemiologia.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1.2 Conceitos e histórico: da antiguidade aos dias atuais.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1.3 Mecanismos moleculares da sepse.....</b>	<b>29</b>
<b>1.1.4 A Inflamação na sepse.....</b>	<b>31</b>
1.2 AMBIENTE REDOX.....	32
<b>1.2.1 Pares redox, regulação do ambiente redox e homeostase de sulfidrilas.....</b>	<b>32</b>
<b>1.2.2 Bioquímica do sistema redox.....</b>	<b>34</b>
1.2.1.1 Aminoácidos oxidáveis: cisteínas reativas como alvos redox.....	34
1.2.1.2 Agentes oxidantes como moduladores da transdução de sinal.....	35
<b>1.2.3 Xenobióticos oxidantes e redutores de sulfidrilas.....</b>	<b>36</b>
1.2.3.1 Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) - DTNB.....	36
1.2.3.2 Ditiotreitól - DTT.....	38
1.3 HIPÓTESE DO TRABALHO.....	40
1.4 OBJETIVOS.....	41
<b>1.4.1 Objetivo geral.....</b>	<b>41</b>
<b>1.4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>41</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
2.1 MATERIAL.....	42

<b>2.1.1 Animais.....</b>	<b>42</b>
<b>2.1.2 Reagentes.....</b>	<b>42</b>
<b>2.1.3 Preparo do DTNB e do DTT para os ensaios farmacológicos.....</b>	<b>42</b>
<b>2.2 MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>2.1.1 Modelo experimental de sepse por pneumonia.....</b>	<b>43</b>
2.1.1.1 Expansão e quantificação da bactéria.....	43
2.1.1.2 Inoculação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em camundongos.....	43
<b>2.2.2 Protocolos experimentais.....</b>	<b>44</b>
2.2.2.1 Padronização do modelo experimental de sepse por pneumonia.....	44
2.2.2.2 Modulação do estado redox.....	45
<b>2.2.3 Avaliação do extravasamento plasmático pulmonar por azul de Evans.....</b>	<b>46</b>
<b>2.2.4 Coleta do lavado broncoalveolar (BAL) .....</b>	<b>46</b>
<b>2.2.5 Contagem total de células no BAL.....</b>	<b>46</b>
<b>2.2.6 Dosagens bioquímicas .....</b>	<b>47</b>
2.2.6.1 Dosagem de nitrito + nitrato (NOx) no BAL.....	47
2.2.6.2 Dosagem de proteínas no BAL.....	47
<b>2.2.7 Quantificação da disseminação bacteriana.....</b>	<b>47</b>
<b>2.2.8 Ensaio de biotinição para a detecção de S-nitrosotióis (Biotin Switch).....</b>	<b>48</b>
<b>2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>50</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
3.1 SOBREVIDA APÓS A INOCULAÇÃO DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	51



3.2 AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO PULMONAR POR AZUL DE EVANS.....	52
3.3 CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS NO BAL.....	54
3.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	56
<b>3.4.1 Dosagem de nitrito + nitrato (NOx) no BAL .....</b>	<b>56</b>
<b>3.4.2 Dosagem de proteínas no BAL.....</b>	<b>58</b>
3.5 QUANTIFICAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO BACTERIANA...60	
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE NITROSOTÍOIS NO TECIDO PULMONAR.....	62
3.7 EFEITO DA MODULAÇÃO DO ESTADO REDOX NA SOBREVIVÊNCIA DE ANIMAIS SÉPTICOS.....	65
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SEPSE

### 1.1.1 Epidemiologia da sepse

Devido ao fato da sepse ser uma condição de caráter multifatorial, de difícil diagnóstico e fisiopatologia complexa e ainda não totalmente elucidada, a sepse é a causa mais comum de ocupação de leitos de unidades de tratamento intensivo (UTI) no Brasil. Segundo Machado e colaboradores (2017), que avaliaram cerca de 300 unidades de terapia intensiva no Brasil, 30,2% dos leitos de UTIs são ocupados por pacientes sépticos, com uma incidência estimada de 36,3% de casos por 1000 pacientes/dia. Além disso, este estudo demonstrou que os pacientes sépticos apresentam uma taxa de mortalidade de 55,7%, e isso resulta numa estimativa de mais de 200.000 mortes por ano de pacientes adultos internados em UTIs no Brasil.

Algumas razões podem ser elencadas para estes altos marcadores epidemiológicos em sepse. Por exemplo, a alta taxa de infecções nosocomiais devido à baixa aderência de medidas preventivas, uma vez que a maioria dos pacientes que evoluem pra um quadro de sepse apresenta inicialmente infecções associadas a serviços de saúde (ROSENTHAL et al., 2014). Outra possível causa dessas taxas elevadas é o fato de que no Brasil existe escassez de unidades de atenção intermediária à saúde, o que pode contribuir para a estadia prolongada dos pacientes em unidades intensivas, com consequente aumento da incidência da sepse (SOARES et al., 2015). Além disso, o aumento da incidência pode estar relacionado ao aumento da parcela idosa da população e com o crescimento da expectativa de vida, assim como ao número cada vez maior de pacientes imunologicamente comprometidos e com outras comorbidades, além do aumento da resistência bacteriana a antibióticos. Porém, apesar dos alarmantes dados epidemiológicos, é importante deixar claro que o cenário pode ser ainda pior e o real número de casos de sepse ser muito maior devido à subnotificação e falta de diagnóstico, uma vez que em muitos casos, a causa oficial da morte do paciente é atribuída às doenças crônicas e não à sepse (ANGUS; WAX et al., 2001; RANGEL-FRAUSTO, 2005; McPHERSON et al., 2013; HOTCHKISS et al., 2016).

Já em relação às populações mais suscetíveis à sepse, sabe-se que idade, sexo e raça são fatores que influenciam, sendo a maior incidência em neonatos e idosos, homens e população negra (ANGUS;

WAX et al., 2001; MAYR et al., 2010). Outro fator determinante para a gravidade da sepse é o perfil do microrganismo agressor. Os agentes etiológicos mais frequentes são as bactérias, sendo responsáveis por 73,8% dos casos de sepse, seguido dos fungos, com uma prevalência de 8,7% dos casos, e por último os casos virais que giram em torno de 1% (BEALE et al., 2009). No que diz respeito ao tipo de infecção primária mais comum, pode-se citar as infecções respiratórias como a pneumonia como a maior causa de sepse, contribuindo com 50% dos casos. O restante dos casos de sepse pode ser atribuído a complicações decorrentes de infecções urinárias, cutâneas e provenientes de traumas abdominais (revisado por MAYR et al., 2014).

### **1.1.2 Conceitos e Histórico: da Antiguidade aos dias atuais**

As primeiras referências na história à sepse foram documentadas há cerca de 2700 anos. Hipócrates, no século IV a.C., instituiu o termo para se referir a um estado perigoso, odorífero e de putrefação da matéria orgânica, com comprometimento biológico: "Quando a febre é contínua, e a superfície externa do corpo está fria, existe internamente uma sensação de calor e sede, a afecção é mortal" (CAIRUS, 2005; revisado por PETTIGREW, 2014). Muitos anos depois foi observado a presença de agentes patogênicos na corrente sanguínea de pacientes que apresentavam sintomas da sepse (revisado por NAMAS et al., 2012). E, embora essa condição seja conhecida há séculos, os profissionais de saúde e pesquisadores ainda enfrentam dificuldades nos critérios de diagnóstico e classificação.

Na atualidade, o conceito fisiopatológico da sepse, após ter sofrido algumas alterações, é definido por uma disfunção orgânica causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção, que pode ser de origem bacteriana, fúngica, viral ou protozoária (SINGER et al., 2016). Na prática clínica, a pluralidade de definições sempre constituiu uma limitação relevante para o melhor conhecimento e diagnóstico da doença. As nomenclaturas utilizadas anteriormente como síndrome séptica, septicemia, infecção generalizada, sepse e sepse grave causavam confusão tanto para a rotina hospitalar quanto para a pesquisa científica (ILAS, 2015)

Portanto, levando em consideração a necessidade de padronização melhor e mais eficiente para a identificação da sepse foi realizado em 1992 a primeira reunião para a promoção de um consenso entre a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e o *American College of Chest Physician* (ACCP). Este consenso, hoje denominado por

*Sepsis-1*, trouxe algumas definições que, em alguns casos, continuam sendo utilizadas até os dias atuais, como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, sepse grave (que caiu em desuso) e choque séptico (BONE et al., 1992). As definições são mostradas no Quadro 1.

**Quadro 1** - Definições de síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sepse, sepse grave e choque séptico de acordo com o *Sepsis-1*.

Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS)	<p>Presença de pelo menos 2 dos seguintes itens:</p> <p>a) temperatura central &gt; 38,3° C ou &lt; 36°C;</p> <p>b) frequência cardíaca &gt; 90bpm;</p> <p>c) frequência respiratória &gt; 20 rpm ou PaCO<sub>2</sub> &lt; 32 mmHg ou necessidade de ventilação mecânica;</p> <p>d) leucócitos totais &gt; 12.000/mm<sup>3</sup> ou &lt; 4.000/mm<sup>3</sup> ou presença de &gt; 10% de formas jovens.</p>
Sepse	SRIS secundária a processo infeccioso confirmado ou suspeito, sem necessidade da identificação do agente infeccioso.
Sepse grave	Presença dos critérios de sepse associada à disfunção orgânica ou sinais de hipoperfusão. Hipoperfusão e anormalidades da perfusão podem incluir, mas não estão limitadas a: hipotensão, hipoxemia, acidose láctica, oligúria e alteração aguda do estado mental.
Choque séptico	Estado de falência circulatória aguda caracterizada pela persistência de hipotensão arterial em paciente séptico, sendo hipotensão definida como pressão arterial sistólica < 90 mmHg, redução de > 40 mmHg da linha de base, ou pressão arterial média < 60 mmHg, a despeito de adequada reposição volêmica, com necessidade de vasopressores, na ausência de outras causas de hipotensão.

Fonte: ILAS, 2015.

Apesar do esforço deste primeiro consenso, as definições sofreram críticas por serem inespecíficas, muito sensíveis e focarem exclusivamente na inflamação, uma vez que era difícil diferenciar SIRS e sepse, já que a SIRS não é uma característica exclusiva da sepse (pode ser evidenciada a SIRS em pacientes politraumatizados, por exemplo) e nem sempre a presença do foco da infecção é claramente notada. Diante do reconhecimento das limitações das definições do primeiro consenso, a SCCM e ACCP se reuniram novamente em 2001, numa conferência para tentar tornar critérios de diagnóstico mais claros.

Neste segundo consenso, hoje denominado *Sepsis-2*, a lista de critérios de diagnóstico foi expandida, mas não apresentou novas alternativas de definições clínicas por falta de dados que as suportassem (LEVY et al., 2003). De fato, as definições de sepse e choque séptico permaneceram sem grandes mudanças por mais de 20 anos.

Reconhecendo a necessidade de revisão das definições, em 2014 a *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM) e a SCCM reuniram um total de 19 especialistas de diferentes áreas, como epidemiologia, estudos clínicos, pesquisa básica e translacional. Os especialistas se basearam nas descobertas atuais das mudanças induzidas pela sepse na disfunção orgânica, morfologia, biologia celular, bioquímica, imunologia e circulação, variáveis denominadas como patobiologia da sepse (SINGER et al., 2016).

Os principais focos deste consenso foram diferenciar a sepse de uma infecção não complicada e atualizar as definições de sepse e choque séptico, baseando-se na patobiologia da doença. Hoje sabe-se que a sepse envolve uma ativação inicial de vias pró- e anti-inflamatórias, com modificações nos sistemas cardiovascular, neuronal autônomo, hormonal, bioenergético, metabólico e da coagulação (SINGER et al., 2004; ANGUS et al., 2013; DEUTSCHMAN; TRACEY, 2013; HOTCHKISS et al., 2013), todas variáveis com importância prognóstica.

Portanto, baseando-se no conhecimento acumulado nas últimas décadas, o consenso *Sepsis-3* primeiramente determinou que a diferença entre a sepse e uma infecção não complicada é que na sepse acontece uma disfunção orgânica causada pela resposta imune desregulada do hospedeiro, fazendo com o que o termo "sepse grave" se tornasse obsoleto. Também ficou determinado que apenas o uso de dois ou mais critérios de SIRS para a identificação da sepse era inútil, uma vez que contagem de leucócitos, temperatura e frequência cardíaca refletem uma inflamação e não necessariamente uma resposta desregulada à infecção, com disfunção orgânica e que ameaça a vida. Ou seja, o foco passou a

ser a disfunção orgânica e tornou-se necessário a identificação mais eficaz dessa condição. Para isso, o *Sepsis-3* encoraja a utilização da Avaliação Sequencial de Falência Orgânica (SOFA, do inglês *Sequential Organ Failure Assessment*) para quantificar as anormalidades orgânicas.

O SOFA, que foi inicialmente desenvolvido como uma ferramenta para avaliar a disfunção orgânica relacionada à sepse (VICENT et al., 1996), mas que hoje em dia é utilizado também em outras situações, é um sistema em que uma pontuação é atribuída baseada na situação clínica do paciente, e o aumento agudo dessa pontuação em dois pontos ou mais caracteriza um quadro de disfunção orgânica. A avaliação dos sistemas respiratório, de coagulação, hepático, cardiovascular, nervoso e renal é realizada através de exames clínicos e laboratoriais. Os parâmetros são mostrados na Tabela 1.



**Tabela 1** - Avaliação sequencial de falência orgânica (SOFA).

Sistema	Escore				
	0	1	2	3	4
<b>Respiratório</b> PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub>	≥ 400	< 400	≤ 300	≤ 200 com suporte respiratório	≤ 100 com suporte respiratório
<b>Coagulação</b> Plaquetas (×10 <sup>3</sup> /μL)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
<b>Cardiovascular</b>	PAM ≥ 70 mm Hg	PAM < 70 mm Hg	Dopamina < 5 ou dobutamina (qualquer dose)*	Dopamina 5.1-15 ou adrenalina ≤ 0.1 ou noradrenalina ≤ 0.1*	Dopamina >15 ou adrenalina ≤ 0.1 ou noradrenalina > 0.1*
<b>Sistema Nervoso Central</b> (escore da escala de coma de Glasgow) <sup>#</sup>	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Renal</b> Creatinina mg/dL	<1.2	1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	>5.0
Diurese (mL/dia)				< 500	< 200
<b>Hepático</b> Bilirrubina mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0

Fonte: Adaptado de SINGER et al., 2016.

Abreviações: PaO<sub>2</sub>, pressão parcial de oxigênio; FIO<sub>2</sub>, fração de oxigênio inspirado; PAM, pressão arterial média; SNC, sistema nervoso central.

\*Doses de catecolaminas dadas em μg/Kg/min por pelo menos 1 h.

<sup>#</sup>Escala de coma de Glasgow: pontuação de 3 a 15; alta pontuação indica melhor função neurológica

Apesar do *SOFA* ser uma avaliação de disfunção orgânica bastante confiável, são necessários testes laboratoriais para a maioria dos parâmetros avaliados, fazendo com que o tempo de diagnóstico seja maior. Pacientes em choque séptico apresentam um aumento da mortalidade de, em média, 7,6% a cada hora de atraso até o início da terapia, tornando o tempo uma variável importantíssima para a melhora

do paciente (KUMAR et al., 2006). Diante disso, foi desenvolvido o *quick SOFA* (qSOFA) que não utiliza testes laboratoriais e permite uma triagem dos pacientes em risco de estarem com sepse, sendo uma ferramenta mais eficaz na predição clínica para pacientes que se encontram fora das UTIs. As variáveis avaliadas no qSOFA são: frequência respiratória maior que 22 ciclos por minuto, pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg e redução do nível da consciência (baseando-se na escala de Glasgow). Se duas dessas variáveis estiverem presentes, recomenda-se a aplicação do SOFA (SEYMOUR et al., 2016; SINGER et al., 2016).

A sepse pode evoluir até o quadro de choque séptico que, de acordo com o *Sepsis-3*, ainda apresenta muitas definições em uso. Segundo Shankar-Hari e colaboradores (2016) que utilizaram uma revisão sistemática, entrevistas e estudos de coorte para chegar a uma definição, o choque séptico pode ser definido como um subconjunto da sepse em que alterações circulatórias, celulares e metabólicas estão associadas com maior risco de mortalidade quando comparado à sepse somente. Clinicamente, os pacientes em choque apresentam hipotensão, com necessidade de utilização de vasopressores para a manutenção da pressão arterial média acima de 65 mmHg e que apresentam o lactato sérico maior que 2 mmol/L, persistente à reposição adequada de fluidos.

### 1.1.3 Mecanismos Moleculares da Sepse

A sepse evolui a partir de uma infecção primária que pode ter origem comunitária ou nosocomial (adquirida em ambiente hospitalar após admissão no serviço). Nos dois casos, a infecção primária mais frequente é a pneumonia, girando em torno de 50% dos casos que se agravam à sepse. Quando a pneumonia é de origem comunitária, as bactérias gram-positivas são as principais causadoras, já nos casos de pneumonia adquirida em ambiente hospitalar, as enterobactérias, que são bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.*, são as principais responsáveis (ANGUS; WAX, 2001; ALBERTI et al., 2002).

Durante o processo de infecção, as células do corpo do hospedeiro reconhecem múltiplos produtos microbianos, como peptidoglicanos, ácido lipoteicoico e flagelina. As bactérias gram-negativas, especificamente, apresentam externamente à parede celular uma camada lipídica cujo um dos constituintes é uma molécula de lipopolissacrídeo (LPS ou endotoxina) cujo principal constituinte, o

lipídeo A, serve para a ancoragem do LPS à parede celular e também o responsável pelas suas atividades biológicas. Essas estruturas são chamadas de Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (revisado por SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015; HOTCHKISS et al., 2016).

As estruturas de reconhecimento dos PAMPs presentes nas células do sistema imune do hospedeiro são conhecidas como Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*). Existem ao menos quatro famílias de PRRs: 1) do tipo Toll (TRL, do inglês *Toll-Like Receptor*), 2) proteínas de repetição ricas em leucina com domínio de oligomerização de nucleotídeos (NOD, do inglês *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*), 3) receptores tipo RIG-1 (do inglês *Retinoic Acid-inducible Gene*) e 4) Receptores de Lectina tipo C (CLR, do inglês *C-type Lecitine Receptor*) (revisado por CINEL; OPAL, 2009).

No caso do LPS, a família de PRRs responsável pelo seu reconhecimento é a família de receptores Toll, especificamente o TLR-4, que são complexados à proteína ligante de LPS e ao CD14. A ativação desses receptores gera uma cascata de sinalização, com recrutamento de várias proteínas citoplasmáticas, que culmina com a ativação de vários fatores de transcrição, dentre eles o Fator Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, *Nuclear Factor Kappa B*), a Proteína Ativadora-1 (AP-1, *Activation Protein 1*), Proteína de Resposta de Crescimento Precoce (EGR-1, *Early Growth Response 1*) e os Sinais Transdutores e Ativadores da Transcrição 1 (STAT 1, *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) (SHERWOOD, 2004; HOTCHKISS et al., 2016).

Esses fatores de transcrição regulam vários genes que estão relacionados principalmente à atividade inflamatória, como por exemplo os genes do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *Tumor Necrosis Factor-alpha*), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e Sintase de Óxido Nítrico-2 (NOS-2) (PAHL, 1999). Isso culminará com a produção de inúmeros eventos inflamatórios como o aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos para os tecidos, onde acontece a produção de ainda mais mediadores secundários como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, amplificando ainda mais o processo inflamatório (revisado por CINEL; OPAL, 2009).

### 1.1.4 A Inflamação na Sepse

Apesar do conceito de SIRS ter caído como ferramenta de diagnóstico da sepse, as variáveis da resposta inflamatória sistêmica continuam sendo utilizadas na clínica com finalidade de monitoramento da evolução do paciente, o que mostra que o componente inflamatório na sepse é bastante evidente. A inflamação, em si, é uma resposta do organismo que visa proteger os tecidos de agressões causadas por agentes nocivos, a fim de evitar a destruição tissular. Existem cinco sinais clínicos característicos durante o processo de inflamação aguda: calor, rubor, edema, dor, e eventualmente, perda da função do tecido afetado (revisado por KUMAR et al., 2014). Porém, em quadros extremos estes eventos não são resolutivos.

Os sinais do processo agudo de inflamação acontecem principalmente pelos eventos celulares e vasculares como a vasodilatação, que aumenta o fluxo sanguíneo, causando hiperemia e aumento da temperatura da região, e o aumento da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento de fluido e proteínas plasmáticas para os tecidos (SHANLEY et al., 1995). Uma das principais complicações inflamatórias apresentadas por pacientes sépticos é a Lesão Pulmonar Aguda/Síndrome da Angústia Respiratória Aguda, cujos eventos moleculares são complexos e resultam da ação de leucócitos polimorfo nucleares no parênquima pulmonar e de mediadores inflamatórios agudos, que induzem o aumento da capilaridade pulmonar, culminando no extravasamento de proteínas e formação de edema, resultando em falência respiratória (STEAMS-KUROSAWA et al., 2011; KING et al., 2014).

Essa disfunção da microvasculatura pulmonar é atribuída a eventos inflamatórios que afetam as células endoteliais. Muitos mecanismos são propostos, como por exemplo, o aumento da exsudação de albumina e o estresse oxidativo causados pelo aumento da produção de óxido nítrico, que leva à retração das células endoteliais pulmonares (BACKER et al., 2002; RAZAVI et al., 2004; WANG et al., 2002; WANG et al., 2012). Foi demonstrando por Guequén e colaboradores (2016) que a oxidação pelo óxido nítrico de sulfidrilas presentes em resíduos de cisteína de caderinas das junções aderentes das endoteliais pulmonares leva à internalização dessas estruturas, com conseqüente hipermeabilidade vascular. Este evento está diretamente ligado ao aumento da migração de leucócitos para o parênquima pulmonar.

De acordo com Sordi e colaboradores (2013), no modelo animal de sepse induzida por pneumonia é possível observar que existem

neutrófilos que aderem às células endoteliais danificadas de capilares pulmonares e transmigram através do interstício até os alvéolos. Essa invasão começa a partir de 6 horas depois da indução da sepse. De fato, os neutrófilos são uma das primeiras linhas de defesa contra patógenos e são responsáveis por conter e eliminar os invasores, uma vez que eles possuem uma quantidade considerável de enzimas proteolíticas e uma rápida produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (BROWN et al., 2006; BORREGAARD, 2010). Porém, na sepse existe uma resposta imune desregulada com ativação de neutrófilos circulantes liberando citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em vários sítios, sendo esta uma das causas da falência de múltiplos órgãos. Além disso, já foi demonstrado que durante essa resposta desregulada essas células podem exibir um fenótipo imunossupressor, apresentando células imaturas e um perfil de citocinas alterado (LELIEFELD et al., 2016). Ou seja, durante a sepse a atividade neutrofílica pode estar afetada, tornando a resposta de defesa ineficaz.

## 1.2 AMBIENTE REDOX

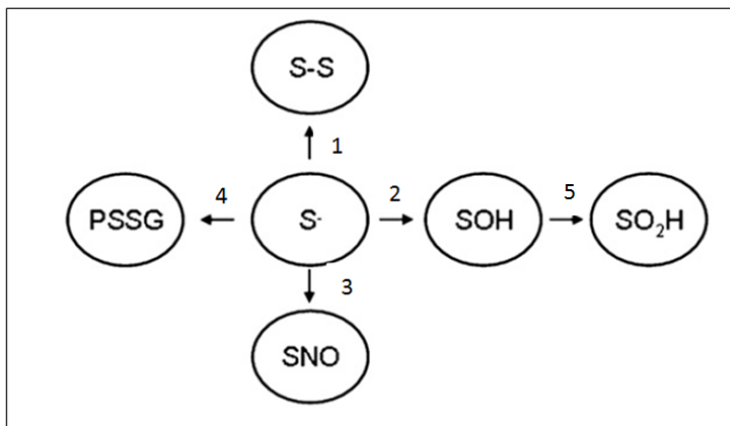
### 1.2.1 Pares Redox, Regulação do Ambiente Redox e Homeostase de Sulfidrilas

O metabolismo celular, mesmo em estados fisiológicos, é acompanhado pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e com isso os organismos desenvolveram um sistema de defesa para garantir proteção contra estas espécies. Este mecanismo de defesa se baseia num conjunto de pares redox que são responsivos ao fluxo de elétrons, ou seja, mudanças no ambiente redutor/oxidante. O termo "Par Redox" descreve a relação de conversão de uma molécula no seu estado oxidado para o seu estado reduzido (e vice-versa). O par redox mais importante é o do sistema tiol não-protéico (NPSH, do inglês, *Non-protein SH*) glutationa, ou GSSH/2GSH, cuja principal função é a desativação de radicais livres (revisado por SCHAFFER; BUETTNER, 2001).

A definição de Ambiente Redox provém da soma dos produtos do potencial de redução ligado a todos os pares redox de um determinado sistema. Porém, é necessário deixar claro que a quantidade de sulfidrilas oxidáveis em proteínas das células e tecidos (PSH, do inglês *Protein SH*) é muito maior do que a de tióis não proteicos (TORCHINSKY, 1981). Estes grupos podem estar presentes na forma

de tióis (-SH), dissulfetos (PS-SP), um dissulfeto misto (PS-SG, quando conjugado com GSH, por exemplo), ou ainda na forma de nitrosotiol (-SNO) (Figura 1), e a homeostase desses tióis tem papel importante na transdução de sinais, regulação da atividade enzimática e mecanismos de sinalização (SERES et al., 1996; BISWAS; CHIDA; RAHAN, 2006; CIRCU; AW, 2010; GHEZZI, 2013).

**Figura 1** - Representação esquemática de modificações de cisteínas reativas.



Fonte: Adaptado de JANSSEN-HEININGER et al., 2008.

1 – Ponte de dissulfeto; 2 – Hidroxilação; 3 – Nitrosilação; 4 – Glutacionilação; 5 - Ácido Sulfinico. O sentido das setas não indica unidirecionalidade da reação.

De fato, existem inúmeros eventos fisiológicos que são mediados por agentes oxidantes de sulfidrilas que controlam a homeostase tissular, divisão celular, migração de leucócitos, contração muscular (RHEE et al., 2000; FINKEL, 2003; HESS et al., 2005; RHEE, 2006). Porém, muitas proteínas envolvidas na inflamação estão sujeitas a mudanças conformacionais por alterações nas suas sulfidrilas, com consequências funcionais. Perturbações na homeostase de sulfidrilas são marcos importantes em muitas doenças, incluindo diabetes (MATTEUCCI; GRAMPIETRO, 2010), câncer (PRABHU et al., 2014), artrite reumatoide (TETIK et al., 2010), doenças

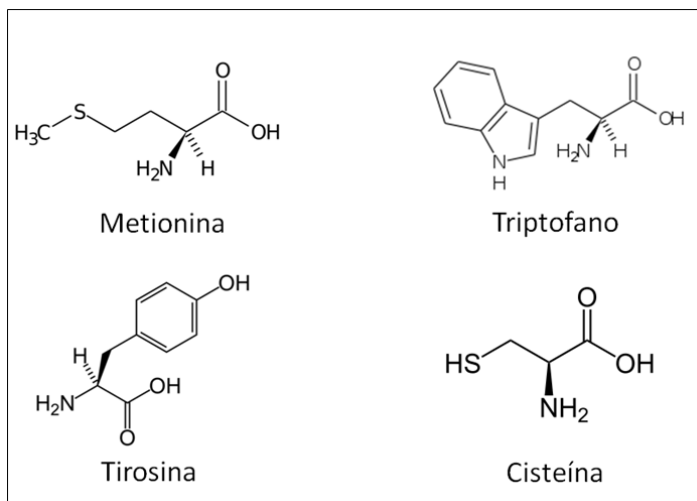
cardiovasculares (GO; JONES, 2011) e na sepse (BENEDET et al., 2018).

## 1.2.2 Bioquímica do Sistema Redox

### 1.2.2.1 Aminoácidos Oxidáveis: Cisteínas Reativas como Alvos Redox

Aminoácidos que são alvos para a oxidação reversível incluem cisteínas com grupos sulfidrilas que possuem  $pK_a$  baixo, o que garante uma susceptibilidade à oxidação que não é observada em sulfidrilas não-reativas que possuem  $pK_a$  mais elevado (revisado por MENG; FUKADA; TONKS, 2002). Além das cisteínas, a metionina, o triptofano e a tirosina (Figura 2) são aminoácidos passíveis de modificações oxidativas, embora o impacto funcional da oxidação destes aminoácidos não esteja tão esclarecido na literatura quanto o da cisteína (revisado por POOLE; KARPLUS; CLAIBORNE, 2002).

**Figura 2** - Aminoácidos que são alvos para oxidações reversíveis.



Fonte: OLIVEIRA, 2019

A possibilidade de acontecer ou não a oxidação desses aminoácidos depende do ambiente em que estes resíduos se encontram. O valor de  $pK_a$  de determinado grupo vai ser estabelecido de acordo com a carga dos aminoácidos adjacentes dentro da estrutura terciária ou quaternária da proteína. No geral, cisteínas cujos grupos sulfidrila estão próximos a aminoácidos básicos ou dos que têm anéis aromáticos possuem  $pK_a > 8,5$  e não são reativas, ou seja, não sofrem ação do sistema redox e nem participam do potencial do ambiente redox (NEDOSPASOV et al., 2000).

#### 1.2.2.2 Agentes Oxidantes como Moduladores da Transdução de Sinal

Apesar de agentes oxidantes serem vistos muitas vezes como vilões, existem vários processos fisiológicos que são mediados por eles. A seletividade e especificidade das moléculas oxidantes dependem basicamente da reatividade química de cada um deles. A maioria dos oxidantes empregados na sinalização em processos fisiológicos produzem oxidação dos tióis de maneira reversível, como por exemplo o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio (HESS et al., 2005; revisado por JANSSEN-HEININGER, 2008).

Espécies oxidantes mais reativas como ozônio, ácido hipocloroso, peroxinitrito e dióxido de nitrogênio oxidam as proteínas de maneira inespecífica. A grande maioria das modificações oxidativas induzidas por este tipo de agente oxidante, como formação da nitrotirosina, não são facilmente reduzidas, sendo consideradas irreversíveis e provavelmente não apresentam função na transdução de sinais, mas com consequência biológica importante.

Porém, de fato, mesmo os agentes oxidantes que induzem oxidação reversível têm vastas ações que estão intrinsecamente ligadas a processos patológicos. Existe um número crescente de evidências que correlacionam doenças neurodegenerativas, inflamatórias e cardiovasculares com oxidação de sulfidrilas (GO; JONES, 2011; MILLER; MIEYAL, 2015).

Alguns estudos comprovam a atividade do sistema redox como modulador da atividade celular. Segundo Liu e Gutterman (2002), agentes oxidantes e redutores possuem a capacidade de modular canais para potássio dependentes de voltagem. Iyer e colaboradores (2009), utilizando uma linhagem de monócitos humanos, demonstraram que quando as células eram expostas a um ambiente externo mais oxidado, isso induzia o aumento da secreção de IL-1 $\beta$ . Além disso, esse mesmo estudo, utilizando uma abordagem *in vivo*, utilizou um modelo de



endotoxemia (administração de LPS) em camundongos e dados obtidos a partir de plasma humano para detectar uma forte relação positiva entre os níveis de IL-1 $\beta$  com a oxidação do plasma. Outro estudo demonstrou a relação da mudança no estado redox plasmático com a fibrose pulmonar (IYER et al., 2009).

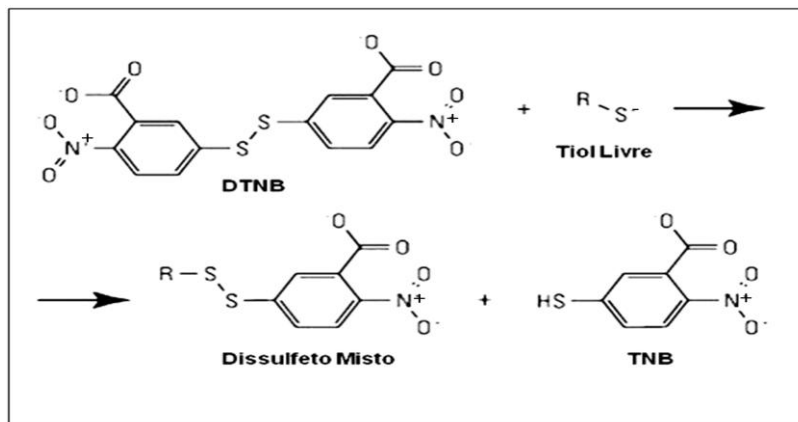
Portanto, fica claro que o ambiente redox, mesmo aquele sistema que se limita ao meio extracelular, quando modificado, tem consequências biológicas extensas. As mudanças do potencial redox em nível plasmático, de membrana celular ou intracelular podem ter efeito sobre vias de sinalização ou transdução de sinais e organelas celulares (revisado por GO; JONES, 2011).

### **1.2.3 Xenobióticos Oxidantes e Redutores de Sulfidrilas**

#### **1.2.3.1 Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) - DTNB**

O ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico), ou DTNB, também conhecido como "Reagente de Ellman" é um reagente que foi desenvolvido na década de 50 para a quantificação de grupos sulfidrilas livres de proteínas e tióis não proteicos (ELLMAN, 1959). A reação se baseia na interação do tiol com o DTNB, que gera um dissulfeto misto e o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (TNB) (Figura 3) que tem intensa cor amarela e pode ser quantificado por absorbância e se correlaciona estequiometricamente com a quantidade de sulfidrilas reativas livres. De acordo com suas características químicas, o DTNB só é solúvel em pH básico e em meio fisiológico ele não atravessa membranas (RIDDLES; BLAKELEY; ZERNER, 1979).

**Figura 3** - Reação de oxidação de tiol livre pelo DTNB.



Fonte: Adaptado de RIDDLES; BLAKELEY; ZERNER, 1979

Apesar do DTNB ser um reagente químico que foi inicialmente pensado para ser utilizado em ensaios de quantificação de tióis, alguns pesquisadores já o utilizaram como ferramenta farmacológica no estudo da modulação do estado redox de um sistema por conta de sua especificidade para oxidar sulfidrilas reativas (ELLMAN, 1959).

De acordo com Cai e Sauve (1997) o DTNB induz a redução da atividade de canais para potássio sensíveis ao cálcio presentes em células endoteliais de aortas. Além disso, Long e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento com DTNB de neurônios hipocâmpais em cultura induzia o aumento da concentração intracelular de cálcio. De maneira interessante, o pré-tratamento com DTNB foi capaz de diminuir a imobilidade de ratos submetidos a modelos de nado forçado, mostrando um efeito *antidepressant-like* (ROSA; DAFRE; RODRIGUES, 2013). Resultados anteriores do nosso laboratório também mostraram o efeito positivo da administração de DTNB em parâmetros cardiovasculares de animais submetidos à sepse por ligadura e perfuração do ceco (BENEDET et al., 2018).

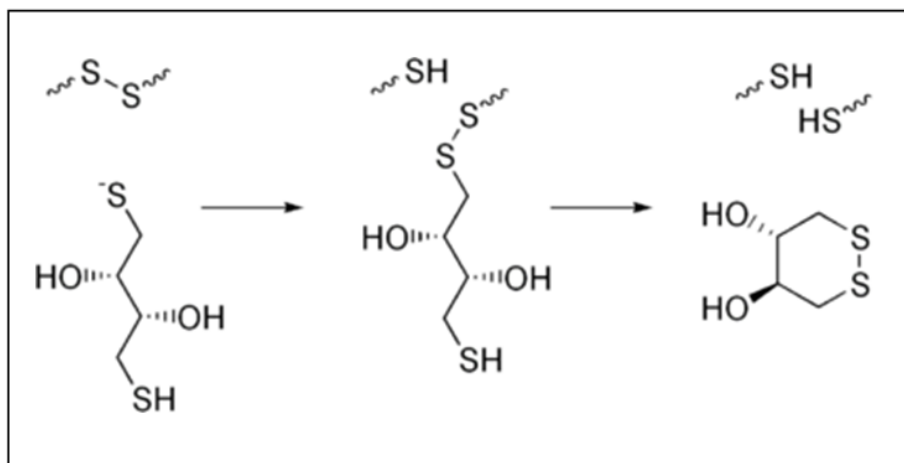
Os mecanismos pelos quais o DTNB exerce esses efeitos ainda não são totalmente esclarecidos, mas uma possível explicação, segundo Martínez-Ruiz (2013), é que os agentes oxidantes de sulfidrilas podem

levar à desnitrosilação de proteínas, afetando o estado redox do sistema, trazendo consequências que ainda precisam ser elucidadas.

### 1.2.3.2 Ditioneitol - DTT

O ditioneitol (DTT) foi sintetizado em 1949 por Evans e colaboradores. Ele é um agente redutor capaz de regenerar sulfidrilas livres por doação de elétrons e é conhecido pela sua capacidade de romper pontes dissulfeto presente em tíois proteicos e não-proteicos (Figura 4) (CLEALAND, 1964).

**Figura 4** - Reação de redução de dissulfetos pelo DTT.



Fonte: Adaptado de CLEALAND, 1964

Alguns estudos utilizaram também o DTT como ferramenta farmacológica para modular o ambiente redox. De acordo com Aizenman, Lipton e Loring (1989), o DTT aumentava as correntes induzidas pela ativação do NMDA em células de cultura de gânglios cerebrocorticais e retiniais. Além disso, experimentos *in vivo* mostraram que a modulação do NMDA pelo DTT alterou o comportamento nociceptivo de camundongos (LAUGHLIN; KITTO; WILCOX, 1998). O DTT restabeleceu a homeostase de sulfidrilas intracelulares, uma vez que ele atravessa membranas, revertendo o efeito na oxidação de proteínas que induzia ao aumento da ubiquitinação em neurônios

(FIGUEIREDO-PEREIRA; YAKUSHIN; COHEN, 1998). Porém, da mesma forma que no caso dos agentes oxidantes, o mecanismo pelo qual o DTT induz essas alterações e a influência do ambiente redox mais reduzido ainda não está completamente esclarecido e as consequências fisiológicas ainda não são conhecidas.

## 1.2 HIPÓTESE DO TRABALHO

Modificações no ambiente redox, mediante oxidação e redução de sulfidrilas, alteram o percurso inflamatório em um modelo de sepse experimental.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da modulação do sistema redox pelo agente oxidante DTNB e pelo agente redutor DTT nos parâmetros inflamatórios da sepse induzida por pneumonia.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de modificações no estado redox:

- I) na permeabilidade vascular pulmonar;
- II) na migração leucocitária para o foco primário da infecção;
- III) na produção de óxido nítrico local;
- IV) na produção de exsudato inflamatório;
- V) na sobrevivência de animais sépticos;
- VI) na disseminação bacteriana;
- VII) nos níveis de nitrosotóis.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Animais

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 30 - 40 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Antes dos experimentos, os animais eram mantidos sob controle alimentar a base de ração com livre acesso a água, com ventilação e temperatura ( $22 \pm 1$  °C) controladas e constantes. Os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA/UFSC (Protocolo nº 2627190617).

#### 2.1.2 Reagentes

Neste estudo, foram utilizados os seguintes compostos: bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de sódio ( $\text{NaHPO}_4$ ), (Merck, Brasil); o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), albumina de soro bovino (BSA), Tris-HCl, sulfanilamida, ácido fosfórico,  $\alpha$ -naftil e Tween-20 foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. LLC (St Louis, MO, EUA); Reagente de Bradford (Bio-rad, São Paulo, SP); heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP); cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina (Syntec do Brasil Ltda., Brasil) e isoflurano (BioChimico do Brasil Ltda., Brasil); BHI (HiMedia, Mumbai, Índia); Mueller Hinton (Kasvi, Itália); azul de Evans e formamida (Neon, São Paulo, SP).

#### 2.1.3 Preparo do DTNB e do DTT para os Ensaios Farmacológicos

O DTNB e o DTT eram armazenados na forma de pó e conservados em freezers a  $-20^\circ\text{C}$ . No momento do experimento, era preparada uma solução de DTNB 5,0 mg/mL em bicarbonato de sódio (5%). As doses eram utilizadas em múltiplos de 2, sendo a dose máxima 126  $\mu\text{mol/kg}$  (equivalente a 50 mg/kg). Já o DTT era preparado em PBS estéril (do inglês, *Phosphate buffered saline*;  $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2,7

mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM e  $\text{NaHPO}_4$  8,1 mM; pH 7,4), na concentração de 2,0 mg/mL e o esquema de dose era o mesmo do DTNB, sendo a dose máxima 126  $\mu\text{mol/kg}$  (equivalente a 20 mg/kg).

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Modelo Experimental de Sepsis por Pneumonia

#### 2.2.1.1 Expansão e Quantificação da Bactéria

A bactéria utilizada nos experimentos foi a *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603 – *American Type Culture Collection*, Rockville, MD). Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  da bactéria liofilizada eram suspensas em 40 mL de caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) em tubo plástico e incubadas a 37°C por 18 horas. Após a incubação, o conteúdo era centrifugado a 2.500 g por 15 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante era descartado e as bactérias eram novamente suspensas em 30 mL de PBS estéril para lavagem das bactérias. Após duas lavagens, o sedimento resultante era resuspenso com auxílio de um agitador de tubos tipo *Vortex* e colocado em microtubos. Diluições seriadas (com um fator de 10) eram realizadas e as densidades ópticas determinadas a 600 nm. Para a quantificação das bactérias, 10  $\mu\text{L}$  das diluições foram plaqueadas em duplicata em condição estéril, em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37°C, por 24 horas. Foram determinados os números de unidades formadoras de colônia (UFC) após 24 horas e calculada a quantidade por mililitro de cada diluição. Realizou-se uma regressão linear relacionando densidade óptica e UFC/mL para estimar o número de UFC de todas as alíquotas feitas nesse lote.

#### 2.2.1.2 Inoculação de *Klebsiella pneumoniae* em camundongos

Após a expansão e determinação da concentração da bactéria por meio da interpolação da medida da absorbância em 600 nm na regressão obtida, descrita no Item 2.2.1.1, a suspensão de bactérias era diluída em PBS estéril na concentração desejada para inoculação nos animais. Para indução da pneumosepsis, os animais eram anestesiados com isoflurano na concentração de 5% e mantidos em plano anestésico profundo com 2% de isoflurano, por via inalatória. Os camundongos eram dispostos em posição supina inclinada (45°C) e uma incisão na



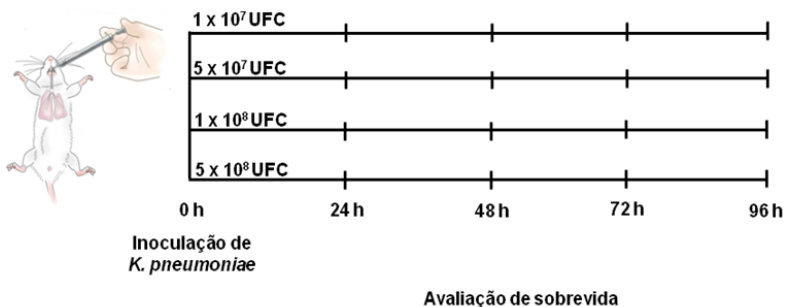
pele do pescoço (5 mm na vertical) era feita em condições assépticas. Em seguida, a traqueia era identificada e 50  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana eram injetados por via intratraqueal (i.t.), com uma agulha estéril de 30 G. Após sutura da pele, os animais recebiam 30 mL/Kg de PBS estéril aquecido ( $37^{\circ}\text{C}$ ), por via subcutânea, para reposição volêmica. Os animais foram mantidos nas suas gaiolas sob aquecimento até a recuperação da anestesia e, posteriormente, eram alojados em ambiente com temperatura e luz controladas.

## 2.2.2 Protocolos Experimentais

### 2.2.2.1 Padronização do Modelo Experimental de Sepsis por Pneumonia

Com a finalidade de se determinar a quantidade de UFC de *Klebsiella pneumoniae* suficiente para ocasionar uma sepsis nos animais, foram realizados experimentos onde foram inoculadas quantidades crescentes de bactéria e a sobrevivência destes animais foi acompanhada a cada 24 h ao longo de 96 h. O número de bactérias viáveis inoculadas por via i.t. por animal foi de  $10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $10^8$  e  $5 \times 10^8$  UFC. Animais *naïve* foram utilizados como controle. Após a inoculação, os animais foram mantidos em local com temperatura e ciclo de luz claro/escuro (12/12 h) controlado automaticamente, com livre acesso à ração e água.

**Figura 5** - Protocolo experimental de padronização do modelo de pneumosepsis.

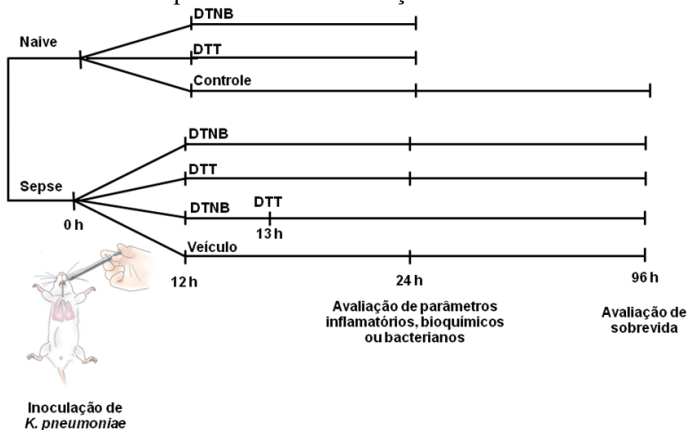


Fonte: OLIVEIRA, 2019.

### 2.2.2.2 Modulação do Estado Redox

Após a inoculação da bactéria, os animais foram divididos em quatro grupos para realização de abordagens distintas de modulação do sistema redox na sepse induzida por pneumonia. A primeira envolveu a oxidação de sulfidrilas em resíduos de cisteína. Para isso, o primeiro grupo recebeu DTNB (31,25 - 126  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) 12 horas após inoculação. O segundo recebeu DTT (31,25 - 126  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) 12 horas após inoculação. E por último, em alguns experimentos de taxa de sobrevivência, ao terceiro grupo foi administrado DTNB (126  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) 12 horas após a indução da sepse e DTT (126  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) 13 horas após administração do DTNB. Um quarto grupo recebeu veículo (bicarbonato de sódio 5%). Doze horas após os tratamentos, ou seja, 24 h após a inoculação da bactéria, foram realizados estudos de parâmetros inflamatórios, bioquímicos e bacterianos, bem como o acompanhamento da sobrevivência dos animais, desta vez ao longo de 96 h. Animais *naïve* foram utilizados como controle, e animais *naïve* tratados e não tratados com DTNB e DTT (ambos 126  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) também foram avaliados. As doses do DTNB e o tempo de tratamento foram escolhidos com base nos resultados anteriores do nosso laboratório (TERLUK, 2005; BENEDET et al, 2018). Já as doses do DTT foram escolhidas usando as do DTNB como referência

**Figura 6** - Protocolo experimental de modulação do estado redox.



### **2.2.3 Avaliação do Extravasamento Plasmático Pulmonar por Azul de Evans**

Após 23h30min da inoculação da bactéria, os animais receberam uma injeção de Azul de Evans (40 mg/kg), via veia gengival. Passados 30 minutos, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico e perfundidos com solução salina (0,9%). Os pulmões foram removidos e incubados em solução aquosa de formamida (1/1, v/v) por 48 h a 55° C. A densidade óptica do sobrenadante foi medida a 600 nm em uma leitora de placas (*SpectraMax® Paradigm®, Molecular Devices*, EUA). As leituras foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante e a formamida foi usada como branco. As concentrações das amostras foram calculadas em microgramas por mililitro e microgramas por grama de tecido.

### **2.2.4 Coleta do Lavado Broncoalveolar (BAL)**

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (200 e 20 mg/kg; i.p.; respectivamente). Os animais tinham suas traqueias expostas e um cateter (21 G) acoplado a uma seringa foi introduzido na traqueia para que se pudesse injetar vagarosamente 0,5 mL de PBS estéril nos pulmões dos animais, sendo em seguida o BAL aspirado de volta à seringa. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. Uma alíquota das amostras de BAL era reservada para a contagem de leucócitos e o restante era centrifugado por 10 minutos a 3000 g. O sobrenadante era imediatamente congelado e armazenado em freezer -80°C por um período nunca superior a duas semanas. O sobrenadante era utilizado para dosagens bioquímicas, conforme descrito no Item 2.2.6.

### **2.2.5 Contagem Total de Células no BAL**

O BAL era diluído em líquido de Türk (2%) e em seguida a contagem total de células feita em câmara de Neubauer. O número de leucócitos nas amostras foi expresso como células x 10<sup>6</sup>/mL de BAL.

## 2.2.6 Dosagens Bioquímicas

### 2.2.6.1 Dosagem de Nitrito + Nitrato (NO<sub>x</sub>) no BAL

Os níveis de NO foram quantificados mensurando-se a soma das concentrações de nitrato + nitrito (NO<sub>x</sub>), utilizando o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água de Milli-Q) como previamente descrito (GRANGER *et al.*, 1990). O BAL foi desproteínizado pela adição de sulfato de zinco (2%). Para a conversão do nitrato para nitrito, as amostras foram incubadas a 37°C, durante 3 h, em presença de nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* cultivada em anaerobiose. Após a conversão enzimática do nitrato a nitrito, as amostras foram centrifugadas para a remoção das bactérias, e 100 µL do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess, produzindo cor lilás. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo a leitura realizada em 540 nm em um leitor de microplacas (*SpectraMax® Paradigm®, Molecular Devices*, EUA). Curvas-padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram realizadas simultaneamente. Como nestas condições a conversão de nitrato para nitrito foi sempre maior que 90%, não foram realizadas correções dos resultados, os quais foram expressos como µM de NO<sub>x</sub>.

### 2.2.6.2 Dosagem de Proteínas no BAL

A quantidade de proteína total no BAL foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Preparou-se uma curva padrão de proteína com albumina de soro bovino nas concentrações entre 0 – 250 µg/mL. As leituras foram efetuadas em comprimento de onda de 595 nm (*SpectraMax® Paradigm®, Molecular Devices*, EUA).

## 2.2.7 Quantificação da Disseminação Bacteriana

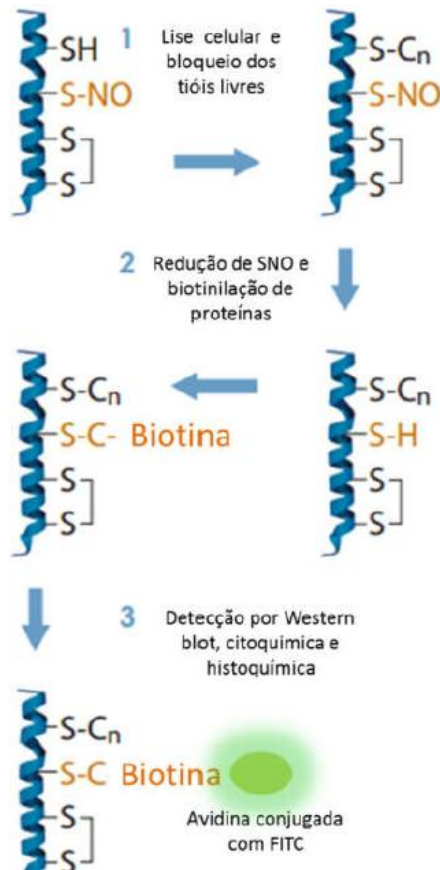
Os animais foram divididos em três grupos (*naïve*, veículo e DTNB 126 µmol/kg). Após o procedimento de eutanásia dos camundongos, foi coletado sangue por punção da aorta abdominal. Depois era coletado o BAL, de acordo com o Item 2.2.4. Em seguida, os animais foram perfundidos com PBS estéril por alguns minutos, para remover o sangue restante nos tecidos. O coração inteiro e o fígado (em torno de 100 µg) foram assepticamente coletados e homogeneizados em 200 µL de PBS estéril. Em seguida, foram feitas diluições seriadas do

BAL ou do homogenato dos tecidos, com um fator de 10, e 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição ou sangue puro foram assepticamente plaqueadas em placas de ágar de Mueller-Hinton a 37°C. Após 24 horas, o número de UFC foi contado e os resultados foram expressos em log de UFC.

### **2.2.8 Ensaio de Biotinilação para Detecção de S-nitrosotióis (*Biotin switch*)**

Para a detecção de proteínas nitrosiladas foi realizado o ensaio *Biotin switch* de acordo com Jaffrey e Snyder (2001) com modificações feitas por Benedet et al., 2018 (Figura 7). Esse ensaio detecta proteínas S-nitrosiladas através da substituição do grupo NO ligado ao resíduo de cisteína pela biotina. Todos os procedimentos a seguir foram feitos no escuro. Após a coleta, os pulmões foram colocados em blocos de Tissue-Tek O.C.T (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, Estados Unidos), congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80°C. Secções transversais, com espessura de 7  $\mu\text{m}$ , foram obtidas com o auxílio de um criostato (Leica CM 1850 UV; Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), colocadas em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). As amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) e posteriormente foi adicionado o agente de bloqueio de sulfidrilas N-etilmaleimida (NEM) 20 mM, por 35 minutos, a 4°C. Após sucessivas lavagens, os cortes foram incubados com 1 mM de ascorbato de sódio e 0,05 mM de N-(3-maleimidilpropionil) biotina por 1 hora, em temperatura ambiente, para a biotinilação das sulfidrilas. Os cortes foram lavados mais algumas vezes e por último foi incubado com avidina conjugada com FITC por 1 hora, em temperatura ambiente. Após a incubação, os cortes foram novamente lavados e depois foram colocadas lamínulas sobre as lâminas utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As lâminas foram acondicionadas em ambiente escuro até o momento da leitura. Para leitura, foi utilizado um microscópio confocal de fluorescência (Leica DMI6000B®, Wetzlar, HE, Germany). A aquisição das imagens foi realizada através do software LAS AF Lite® (Leica Microsystems®, Wetzlar, HE, Germany). Cada grupo experimental tinha n = 5. A quantificação da intensidade de fluorescência foi realizada pelo software NIH ImageJ 1.50i imaging software (NIH, Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

**Figura 7** - Representação esquemática do ensaio de *Biotin Switch*.



Fonte: Adaptado de Cayman Chemical Company, 2016.

Proteínas podem apresentar resíduos de cisteínas com tiol livre, nitrosotiol e ligação dissulfeto, entre outros. 1 - Os tióis livres são derivatizados pelo agente de bloqueio NEM, tornando-os não reativos. 2 - Depois, os nitrosotióis são reduzidos pela ação do ascorbato de sódio (agente redutor) formando tiol, o qual reage covalentemente com a biotina-maleimida. 3 - A revelação é feita por fluorescência e a detecção da biotinylation é realizada pela ligação a avidina conjugada com FITC.

## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas das curvas de sobrevida foram realizadas pelo teste de log-rank. As diferenças entre as curvas representativas de cada grupo experimental foram consideradas significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ . As demais análises estatísticas não paramétricas foram realizadas através dos testes de Mann-Whitney, sendo os resultados expressos como mediana, conforme indicado na legenda das figuras.

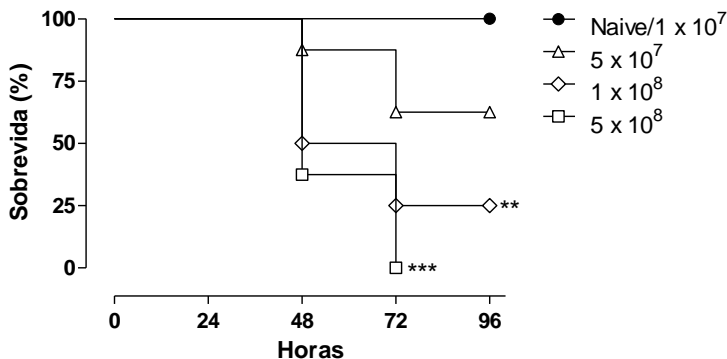
Os demais resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média e a estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo *post hoc* de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism® versão 5.01 (San Diego, CA, US

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 SOBREVIDA APÓS A INOCULAÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae*

Inicialmente se fez necessário realizar a determinação da relação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *K. pneumoniae* com a sobrevivência dos animais após a inoculação em até 96 h. A Figura 8 mostra que há uma relação entre o número de UFC de bactérias inoculadas e a taxa de mortalidade dos animais. A taxa de sobrevivência em 96 h foi de 100%, 63%, 25% e 0% nos grupos inoculados com  $1$  e  $5 \times 10^7$  e  $1$  e  $5 \times 10^8$  UFC por animal, respectivamente. Os animais que receberam  $1 \times 10^7$  UFC *naïve* sobreviveram. Portanto, levando em consideração esses resultados, para experimentos que se seguiram, foi utilizado o número de  $1 \times 10^8$  UFC por animal, uma vez que a taxa de mortalidade ficou em torno de 50% em 48 h.

**Figura 8** - Curva de sobrevivência após a inoculação de *Klebsiella pneumoniae* em camundongos.



Fonte: OLIVEIRA, 2019.

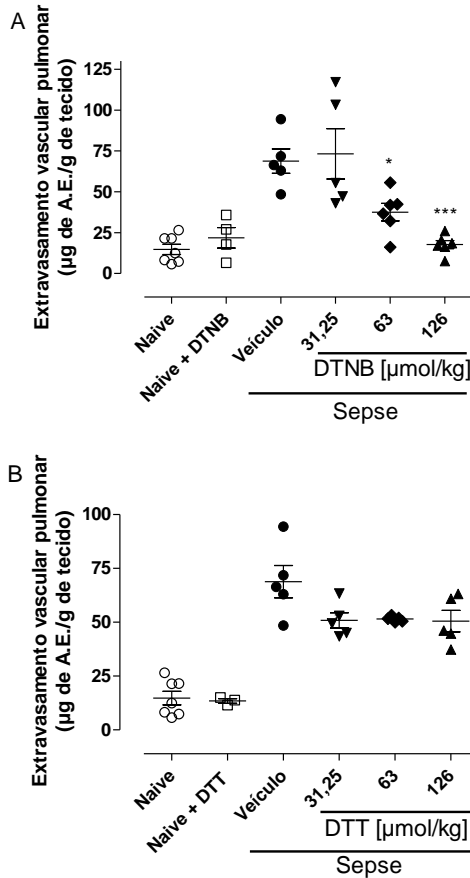
Os animais foram inoculados (i.t.) com *K. pneumoniae* ( $1$  e  $5 \times 10^7$  e  $1$  e  $5 \times 10^8$  UFC/animal) e a sobrevivência foi avaliada por até 96 h. Os animais controles receberam a inoculação do mesmo volume de PBS e assim como o grupo que recebeu  $1 \times 10^7$  UFC, todos sobreviveram. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência ( $n = 8$ ). A análise estatística utilizada foi o teste de log rank \*\* $p = 0,0024$  e \*\*\* $p = 0,0002$  quando comparado ao grupo controle.



### 3.2 AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO PULMONAR POR AZUL DE EVANS

O extravasamento pulmonar foi maior nos animais submetidos à sepse induzida por pneumonia e que receberam o veículo ( $68,8 \pm 7,5 \mu\text{g A.E./g}$  de tecido) quando comparado ao grupo *naïve* ( $14,7 \pm 3,1 \mu\text{g A.E./g}$  de tecido). Quando os animais foram tratados com DTNB, apesar de não ter tido nenhum efeito significativo sobre os animais *naïve* ( $21,8 \pm 6,2 \mu\text{g A.E./g}$  de tecido,  $126 \mu\text{mol/kg}$ , s.c.), o aumento do extravasamento vascular nos animais sépticos foi revertido de maneira dependente de dose ( $63$  e  $126 \mu\text{mol/kg}$ , s.c.) com valores de  $37,5 \pm 5,3$  e  $17,7 \pm 2,5 \mu\text{g A.E./g}$  de tecido, respectivamente (Figura 9A). Já quando os animais sépticos foram tratados com DTT ( $31,25$  -  $126 \mu\text{mol/kg}$ , s.c.), não foi observado nenhum efeito sobre este parâmetro (Figura 9B).

**Figura 9** – Efeito do DTNB (A) e do DTT (B) no extravasamento vascular pulmonar em camundongos submetidos à sepse induzida por pneumonia.



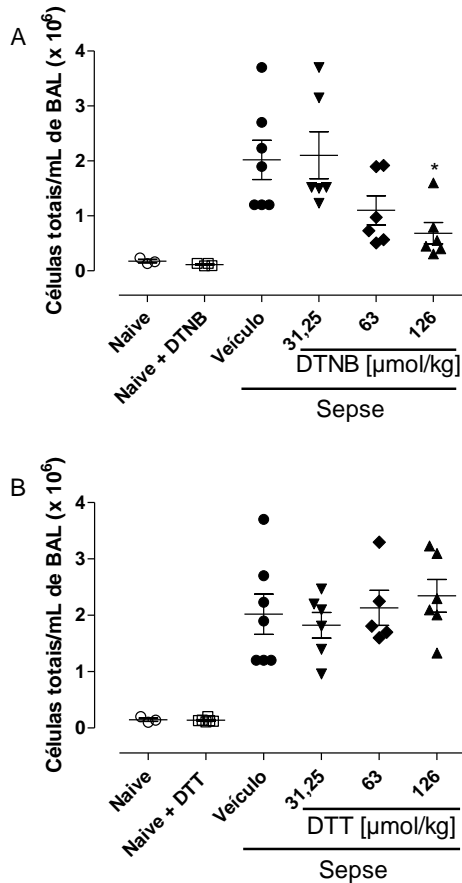
Fonte: OLIVEIRA, 2019.

Os animais foram inoculados (i.t.) com *K. pneumoniae* ( $1 \times 10^8$  UFC/animal). Doze horas após, os animais foram tratados com diferentes doses de DTNB (A), DTT (B) ou veículo (s.c.), e o extravasamento vascular pulmonar foi avaliado 24 horas após a indução da sepse. Cada animal é representado por um símbolo individual e as barras horizontais e as verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 3-7). ANOVA “one-way” seguido de Tukey: \*  $p < 0,05$  ou \*\*\*  $p < 0,001$  (veículo vs. DTNB);

### 3.3 CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS NO BAL

Como mostrado na Figura 10A, os animais sépticos que receberam o veículo apresentaram um aumento na quantidade de leucócitos no lavado broncoalveolar ( $2,02 \pm 0,35 \times 10^6$  células/mL) quando comparado ao grupo *naïve* ( $0,18 \pm 0,03 \times 10^6$  células/mL). O DTNB, embora não tenha afetado o número de células no BAL de animais *naïve* ( $0,11 \pm 0,01 \times 10^6$  células/mL), na dose de 126  $\mu\text{mol/kg}$  (s.c.) foi capaz de reduzir a migração de leucócitos para o espaço alveolar de animais sépticos ( $0,68 \pm 0,2 \times 10^6$  células/mL). O tratamento com DTT (31,25 - 126  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) não apresentou nenhuma influência na contagem de células do lavado (Figura 10B).

**Figura 10** – Avaliação das células do lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com *K. pneumoniae* e tratados com DTNB (A) e DTT (B).



Fonte: OLIVEIRA, 2019.

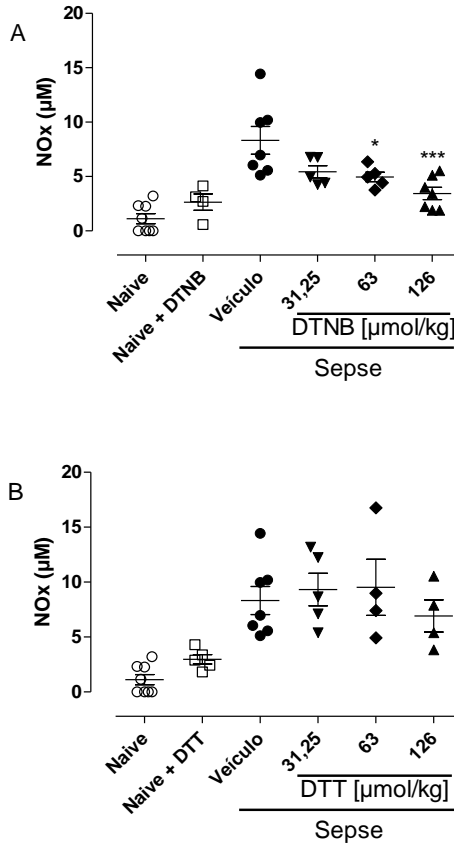
Os animais foram inoculados (i.t.) com *K. pneumoniae* ( $1 \times 10^8$  UFC/animal). Doze horas após, os animais foram tratados com diferentes doses de DTNB (A), DTT (B) ou veículo (s.c.), e o número total de leucócitos no BAL foi avaliado 24 horas após a indução da sepsse. Cada animal é representado por um símbolo individual e as barras horizontais e as verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ( $n = 3-7$ ). ANOVA “one-way” seguido de Tukey: \*  $p < 0,05$  (veículo vs. DTNB);

### 3.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

#### 3.4.1 Dosagem de Nitrito e Nitrato (NOx) no BAL

A produção local de metabólitos do NO (NOx: nitrato + nitrito) também foi avaliada. Coincidindo com os resultados de contagem total dos leucócitos no BAL, os animais sépticos que receberam o veículo apresentaram maiores concentrações de NOx ( $8,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ ) quando comparado aos animais *naïve* ( $1,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ). O DTNB não alterou a dosagem dos metabólitos do NO em animais *naïve* ( $1,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ), porém, quando administrado em animais sépticos (63 e 126  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), reduziu de maneira dependente de dose a produção local de NO, com valores de  $5,0 \pm 0,4$  e  $3,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 11A). Já o DTT, assim como citado anteriormente, não teve nenhum efeito na produção local de óxido nítrico (Figura 11B).

**Figura 11** – Dosagem de nitrito + nitrato (NOx) no lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com *K. pneumoniae* e tratados com DTNB (A) e DTT (B).



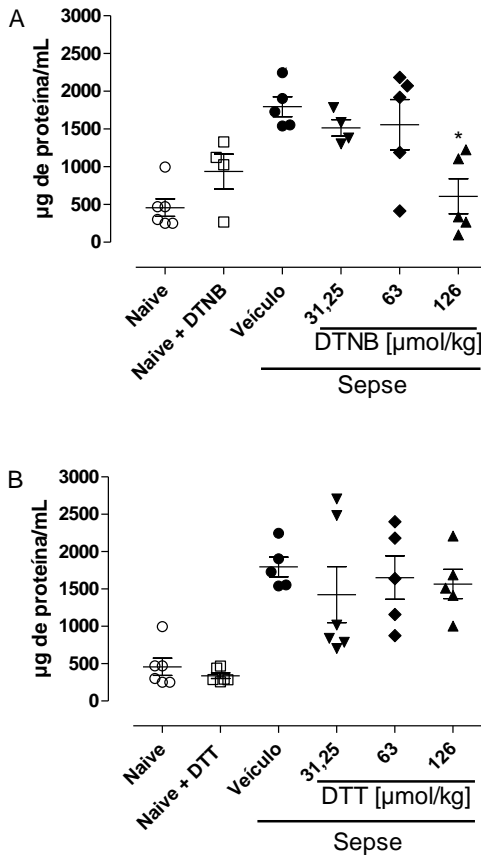
Fonte: OLIVEIRA, 2019.

Os animais foram inoculados (i.t.) com *K. pneumoniae* ( $1 \times 10^8$  UFC/animal). Doze horas após, os animais foram tratados com diferentes doses de DTNB (A), DTT (B) ou veículo (s.c.), e a dosagem de nitrito + nitrato (NOx) no BAL foi avaliada 24 horas após a indução da sepse. Cada animal é representado por um símbolo individual e as barras horizontais e as verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 4-7). ANOVA “one-way” seguido de Tukey: \*\*  $p < 0,01$  (veículo vs. DTNB).

### 3.4.2 Dosagem de Proteínas no BAL

A análise da quantidade de proteínas no lavado broncoalveolar mostrou que os animais sépticos que receberam o veículo apresentaram um aumento da quantidade de proteína no espaço alveolar ( $1795 \pm 131,5$   $\mu\text{g}$  de proteína/mL) quando comparado ao grupo *naïve* ( $457,3 \pm 115,5$   $\mu\text{g}$  de proteína/mL). O tratamento com o DTNB ( $126 \mu\text{mol/kg}$ , s.c.), como pode ser visto na Figura 12A, foi capaz de reduzir níveis de proteína no BAL de animais submetidos à sepse ( $607,8 \pm 232,5$   $\mu\text{g}$  de proteína/mL). O DTT, por outro lado, não apresentou nenhum efeito sobre a quantidade de proteína do espaço alveolar dos animais sépticos (Figura 12B).

**Figura 12** – Dosagem de proteínas no lavado broncoalveolar de camundongos inoculados com *K. pneumoniae* e tratados com DTNB (A) e DTT (B).



Fonte: OLIVEIRA, 2019.

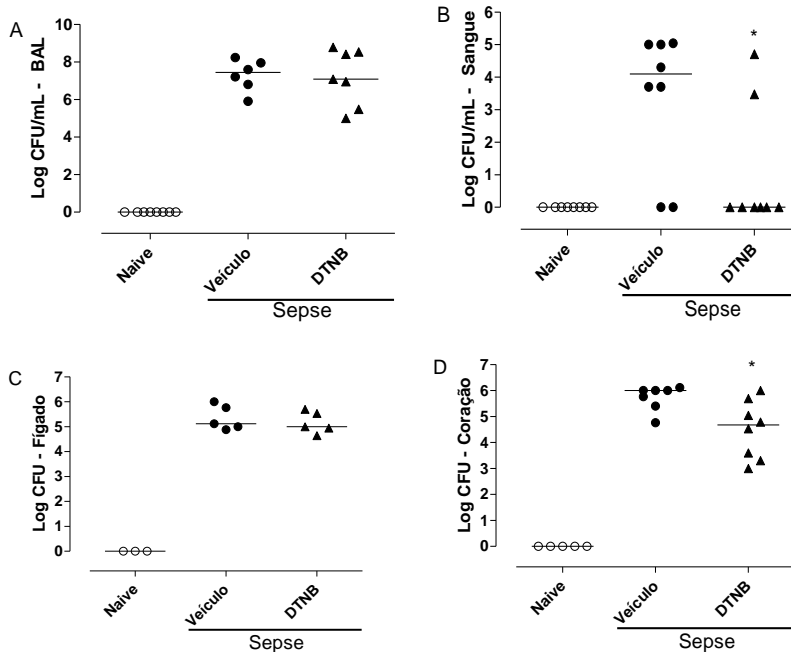
Os animais foram inoculados (i.t.) com *K. pneumoniae* ( $1 \times 10^8$  UFC/animal). Doze horas após, os animais foram tratados com diferentes doses de DTNB (A), DTT (B) ou veículo (s.c.), e a dosagem de proteínas no BAL foi avaliada 24 horas após a indução da sepse. Cada animal é representado por um símbolo individual e as barras horizontais e as verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 4-7). ANOVA “one-way” seguido de Tukey: \*  $p < 0,05$  (veículo vs. DTNB).



### 3.5 QUANTIFICAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO BACTERIANA

A Figura 13 ilustra a carga bacteriana (UFC) das amostras de BAL (A), sangue (B) e em homogenatos de tecido hepático (C) e cardíaco (D). Como pode ser observado, há um grande número de UFC de *K. pneumoniae* nas amostras de BAL de animais sépticos que receberam veículo ( $2,8 \times 10^7$  UFC/mL), e os animais sépticos tratados com DTNB não apresentaram nenhuma diferença ( $1,2 \times 10^7$  UFC/mL) na quantidade de bactéria no foco primário da infecção. Já no sangue, pode-se observar que o tratamento com o DTNB diminuiu a quantidade de bactérias ( $< 10^3$  UFC/mL) quando comparado ao grupo séptico que recebeu o veículo ( $1,25 \times 10^4$  UFC/mL). Dentre os órgãos avaliados, foi observado que a carga bacteriana no fígado de animais sépticos tratados com DTNB ( $10^5$  UFC/mL do homogenato) não foi diferente de animais sépticos que receberam veículo ( $1,3 \times 10^5$  UFC/mL do homogenato). Já no coração, assim como no sangue, o DTNB foi capaz de reduzir a disseminação tissular das bactérias ( $4,8 \times 10^4$  UFC/mL do homogenato) quando comparado ao grupo séptico ( $10^6$  UFC/mL do homogenato).

**Figura 13** – Avaliação da disseminação bacteriana no lavado broncoalveolar (A), sangue (B), fígado (C) e coração (D) de camundongos inoculados com *K. pneumoniae*.



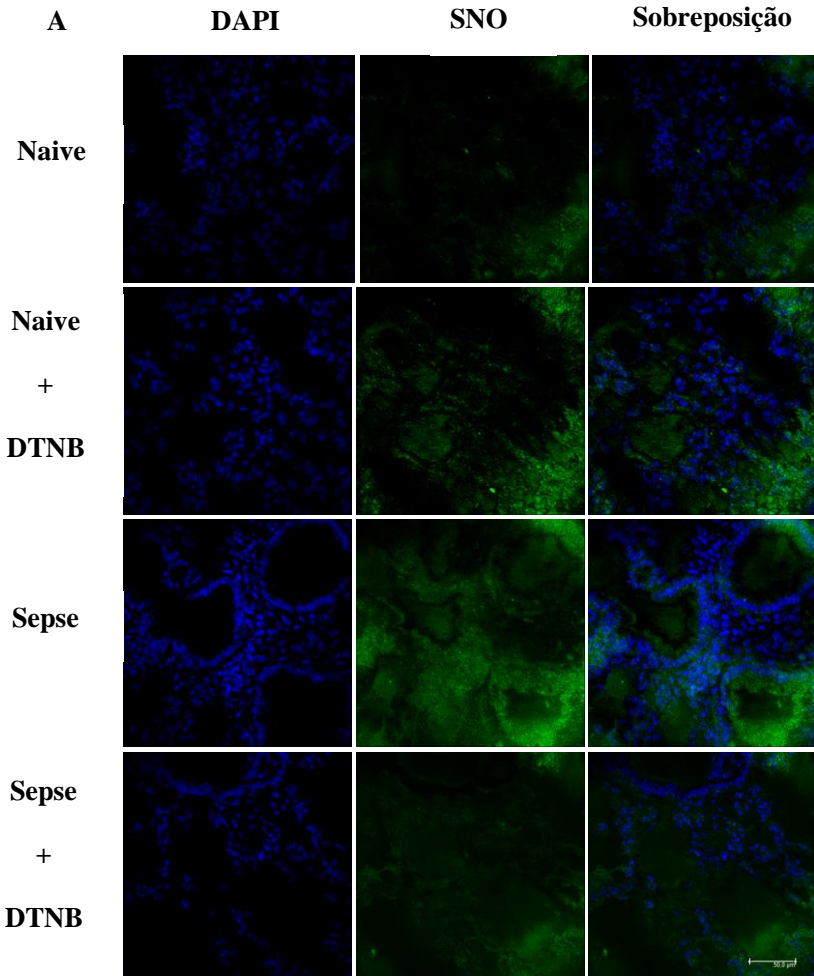
Fonte: OLIVEIRA, 2019.

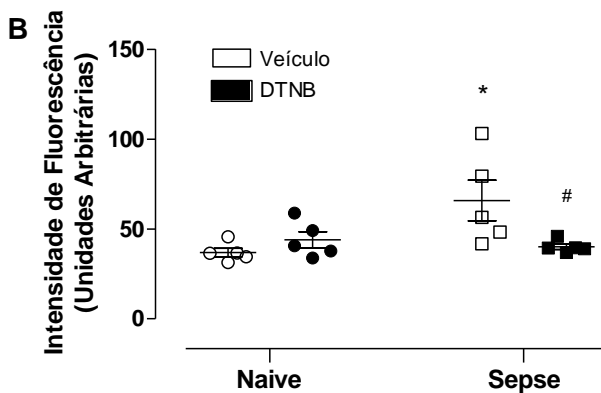
Os animais foram inoculados (i.t.) com *K. pneumoniae* ( $1 \times 10^8$  UFC/animal). Doze horas após, os animais foram tratados com 126  $\mu\text{mol/kg}$  de DTNB ou veículo (s.c.). Os animais foram eutanasiados 24 horas após indução da sepse. As amostras de BAL (A), sangue (B), fígado (C) e coração (D) foram obtidas, diluídas, semeadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas por 24 horas. Os resultados foram expressos como log de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL (sangue e BAL) ou UFC por órgão (fígado e coração). Cada animal é representado por um símbolo individual e as barras horizontais representam a mediana ( $n = 3-8$ ). Mann-Whitney: \*  $p < 0,05$  (veículo vs. DTNB).

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DE NITROSOTIÓIS NO TECIDO PULMONAR

A Figura 14 mostra que ocorre um aumento da intensidade de fluorescência representando a formação de SNO no pulmão de camundongos sépticos ( $65,8 \pm 11,3$  Unidades Arbitrárias) quando comparados ao pulmão de camundongos *naïve* ( $36,9 \pm 2,4$  U.A.). A intensidade de fluorescência caiu a níveis iguais aos dos animais *naïve* quando os camundongos sépticos foram tratados com DTNB ( $126 \mu\text{mol/kg}$ , s.c.), com valores absolutos de  $40,1 \pm 1,5$  U.A. Além disso, foi observado que o DTNB não altera os níveis de SNO basais, pois os cortes de pulmões de animais *naïve* que foram tratados com DTNB ( $126 \mu\text{mol/kg}$ , s.c.) não apresentaram aumento nem diminuição na intensidade de fluorescência, com valores de  $44 \pm 4,5$  U.A. A quantificação pode ser observada na Figura 14B.

**Figura 14** - Análise por fluorescência da quantidade de nitrosotióis em tecido pulmonar de animais sépticos tratados com DTNB.





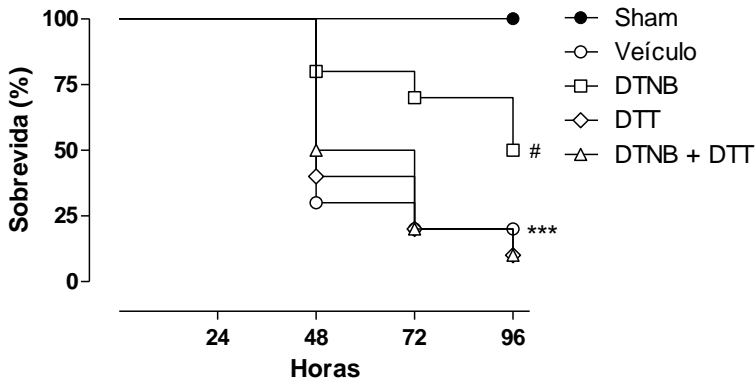
Fonte: OLIVEIRA, 2019.

Os animais foram inoculados (i.t.) com *K. pneumoniae* ( $1 \times 10^8$  UFC/animal). Doze horas após, os animais foram tratados com 126  $\mu\text{mol/kg}$  de DTNB ou veículo (s.c.). Os animais foram eutanasiados 24 horas após indução da sepse. Os pulmões foram coletados, emblocados e congelados em nitrogênio. No dia seguinte, foram feitos cortes histológicos e o ensaio do *Biotin switch*. Imagens representativas da marcação de nitrosotióis (figura 14A) e representação gráfica da intensidade de fluorescência (figura 14B). As barras verticais e as horizontais representam a média e o e.p.m., respectivamente ( $n = 5$ ). ANOVA “one-way” seguido de Tukey: \*  $p < 0,05$  (naive veículo vs. sepse veículo) e # $p < 0,05$  (sepse veículo vs. sepse DTNB).

### 3.7 EFEITO DA MODULAÇÃO DO ESTADO REDOX NA SOBREVIDA DE ANIMAIS SÉPTICOS

Como pode ser observado na Figura 15, os animais sépticos que receberam o veículo apresentaram uma taxa mortalidade de 80% em 96 horas. O tratamento com DTNB melhorou consideravelmente a taxa de sobrevivência dos animais, apresentando um aumento de 30% da sobrevida em 96 horas. O grupo que recebeu apenas o DTT não apresentou diferença na taxa de sobrevivência quando comparado ao grupo que recebeu o veículo. Porém, o DTT foi capaz de anular completamente o efeito protetor quando administrado 1 hora após o DTNB, apresentando uma taxa de mortalidade de 90% em 96 horas. Essa curva de sobrevivência foi reproduzida em 2 experimentos distintos e em períodos diferentes.

**Figura 15** - Efeito da modulação do estado redox através da administração de agentes oxidante e redutor de sulfidrilas na sobrevida de animais sépticos.



Fonte: OLIVEIRA, 2019.

Os animais foram inoculados (i.t.) com *K. pneumoniae* ( $1 \times 10^8$  UFC/animal) e 12 h após a indução da sepse, os animais foram divididos em 5 grupos: grupo falso-operado (*sham* - círculos fechados), veículo (círculos), DTNB (126  $\mu$ mol/kg, s.c.; quadrados), DTT (126  $\mu$ mol/kg, s.c.; losangos) e DTNB + DTT (ambos 126  $\mu$ mol/kg, s.c.; triângulos) e a sobrevida foi avaliada por até 96 h. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência ( $n = 10$ ). A análise estatística utilizada foi o teste de *log rank* \*\*\*  $p = 0,0004$  quando comparado ao grupo *sham* e #  $p = 0,0356$  quando comparado ao veículo.

## 4 DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar a influência do ambiente redox no perfil inflamatório no processo séptico, dois agentes moduladores do potencial redox foram administrados em animais submetidos ao modelo de sepse induzida por pneumonia. Os parâmetros inflamatórios foram avaliados, sendo investigado também um possível mecanismo pelo qual essa mudança do estado redox pode acontecer. Foi mostrado que a oxidação do ambiente redox pelo DTNB induz melhoria do processo inflamatório num quadro séptico e, conseqüentemente, na sobrevida dos animais, ao passo que a redução das sulfidrilas pelo DTT, *per si*, não influenciou no processo inflamatório durante a sepse, mas reverte o efeito protetor do DTNB na sobrevida dos animais.

No estudo da fisiopatologia da sepse são utilizados modelos animais que há anos vem trazendo novas perspectivas em relação à doença. De fato, a translação de dados de estudos na pesquisa básica utilizando animais para o ambiente clínico deve ser feita com cautela, principalmente por conta de diferenças fisiológicas entre as espécies. Os modelos experimentais de sepse são criticados por conta das diferenças na natureza do agente iniciante da doença, tempo de desenvolvimento dos eventos patológicos, ausência de comorbidades e ausência de suporte e cuidados, como reposição de fluidos, vasopressores e ventiladores mecânicos que são comumente utilizados na clínica (ESMON, 2004; BURRAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005). Porém, ainda assim, muito dos avanços que foram importantes para a determinação das novas definições da sepse com o consenso *Sepsis-3* se devem aos estudos da fisiopatologia da doença na pesquisa básica.

Os pulmões são os focos de infecção primária mais comuns, contando com quase 50% dos casos de sepse de todas as fontes de infecção. Dentre os principais microrganismos responsáveis pela sepse bacteriana, pode-se citar as bactérias gram-negativas, principalmente as enterobactérias (TSIOTOU et al., 2005). Para a realização deste trabalho foi utilizado um modelo de sepse induzida por pneumonia, ou pneumosepse. Uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* foi utilizada como microrganismo causador da doença, e apesar deste modelo não induzir uma sepse polimicrobiana, como acontece com mais frequência na clínica, esta é uma das espécies com maior incidência dos casos na sepse humana (ANGUS; POLL, 2013). Além disso, o decurso temporal dos eventos patológicos neste modelo é muito mais lento que em outros modelos experimentais, dando uma maior janela de trabalho para o pesquisador (SORDI et al, 2013). Ademais, este modelo se torna muito

útil num ambiente de pesquisa laboratorial, uma vez que permite a manipulação do quadro infeccioso ao aumentar ou diminuir o número de UFC injetado, tornando a sepse mais branda ou mais grave, de acordo com o objetivo do pesquisador. Portanto, o modelo de pneumosepse em camundongos é capaz de mimetizar alguns aspectos clínicos da sepse.

Nossos resultados mostram características importantes do modelo experimental. Primeiro, pode-se perceber que a mortalidade dos animais só se iniciou a partir de 48 horas, independente do número de UFC inoculados. Isto difere de outros modelos, como o de ligadura e perfuração do ceco (CLP), cuja mortalidade dos animais, dependendo da quantidade de conteúdo intestinal extravasado ou da intensidade da ligadura, começa nas primeiras 6 ou 12 horas após o procedimento, o que fica mais distante da reprodução do curso temporal de uma sepse em humanos.

Outra vantagem do modelo de pneumosepse é que a mortalidade se correlaciona com o número de UFC inoculados. Animais que receberam  $1 \times 10^7$  UFC apresentaram 100% de sobrevivência ao final de 96 horas, enquanto aqueles que receberam  $1 \times 10^8$  UFC apresentaram mortalidade em torno de 50% em 48 horas e os que receberam  $5 \times 10^8$  UFC apresentaram 100% de mortalidade em 72 horas. Este modelo experimental é bastante reprodutível e bem padronizado, como já demonstrado em diferentes publicações do nosso grupo de pesquisa (SORDI et al., 2013a; SORDI et al., 2013b; HOREWICZ et al., 2015). Entretanto, estes trabalhos anteriores foram realizados utilizando camundongos machos. Portanto, uma vez que camundongos fêmeas foram utilizadas para realização desse estudo, foi necessário uma nova padronização do método no laboratório. Diante disso, o número de  $1 \times 10^8$  UFC foi escolhido para os demais experimentos, tornando possível que uma sepse consideravelmente grave se instalasse e que os parâmetros fossem avaliados em 24 h após a inoculação da bactéria.

Depois de estabelecida a padronização do método experimental e definido o número de UFC que seria utilizado nos experimentos seguintes, foi realizada a avaliação dos parâmetros inflamatórios. Inicialmente foi avaliado a formação de edema pulmonar através da técnica de quantificação usando o azul de Evans. A quantificação do extravasamento plasmático pelo azul de Evans é uma metodologia muito bem estabelecida na literatura e utilizada há décadas. O corante azul de Evans é conhecido por se ligar quantitativamente à albumina tanto *in vitro* (STEINWALL; KLATZO, 1966) quanto *in vivo* (RAWSON, 1943). Os primeiros trabalhos que avaliaram a formação de edema no



trato respiratório por esta técnica datam da década de 80 quando Lundberg e Saria (1982) avaliaram a influência vagal no controle da permeabilidade vascular e do tônus do músculo liso na traqueia e brônquios.

A permeabilidade vascular é um evento que precisa ser bem regulado para a garantia do funcionamento correto dos tecidos e órgãos. As junções celulares exercem uma função muito importante nessa tarefa de manutenção da integridade vascular. O aumento do extravasamento pode acontecer em situações fisiológicas, através de agentes inflamatórios e pela produção de citocinas, que induzem cascatas de sinalização intracelular nas células endoteliais que podem culminar com a desconexão das junções aderentes e retração endotelial. Este fenômeno acontece para que se facilite a passagem de células e solutos até o interstício e na maioria dos casos as mudanças na permeabilidade são reversíveis e as junções celulares se fecham rapidamente (revisado por VESTWEBER et al., 2009).

Porém, existem diversos mecanismos pelos quais a permeabilidade vascular pode ser aumentada e isso depende principalmente da natureza do agente que está induzindo este aumento. Por exemplo, agentes inflamatórios como a histamina, bradicinina e trombina, que aumentam a permeabilidade de maneira rápida e reversível, agindo por vias diferentes das vias que são ativadas por citocinas, como a interleucina-1 e o TNF- $\alpha$ , que mantém a permeabilidade elevada por horas e até dias após sua indução (ANDRIOPOULOU et al., 1999; revisado por VESTWEBER; BROERMANN; SCHULTE, 2010; ZHU et al., 2012).

O estado redox parece também ser um importante regulador da permeabilidade vascular (GOITRE et al., 2017). Han e colaboradores (2016) mostraram que a S-glutationilação de células endoteliais podem ser um dos mecanismos envolvidos no aumento da permeabilidade vascular em desordens metabólicas como a diabetes. Além disso, resultados anteriores do nosso laboratório demonstraram que existe aumento da oxidação pelo óxido nítrico em aorta de ratas submetidas ao CLP (BENEDET et al., 2018).

No nosso modelo experimental de pneumosepse houve aumento da permeabilidade vascular no pulmão de animais sépticos quando comparados aos animais *naïve*. Este aumento, que foi revertido quando os animais foram tratados com DTNB, porém não apresentou diferença quando os animais foram tratados com DTT. Com isso, podemos sugerir que o deslocamento do ambiente redox para uma condição de oxidação com o uso do DTNB protegeu os animais. Uma possibilidade para

explicar este achado é que o desvio para um ambiente oxidado reduziu ou inibiu a oxidação por produtos endógenos produzidos no processo séptico. Em contraste, o deslocamento do ambiente para uma situação de redução não modificou o aumento da permeabilidade vascular induzida pela sepse.

Outro parâmetro inflamatório avaliado foi a migração de células de defesa para o pulmão. Para isto, foi realizada a contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar. Em um trabalho anterior do nosso grupo, Sordi e colaboradores (2013) avaliaram o decurso temporal de migração leucocitária no modelo de pneumosepse e foi visto que o pico de migração acontece após 24 horas do insulto, e após 48 horas o número de leucócitos no local da infecção já começa a diminuir, talvez por ação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Já o perfil leucocitário sanguíneo desses animais apresenta a composição oposta, pois 24 horas após o insulto, os animais apresentaram leucopenia, voltando a apresentar valores normais 48 horas após o insulto.

Os resultados mostram que, após 24 horas, os animais submetidos à pneumosepse apresentaram um aumento na quantidade de leucócitos no lavado broncoalveolar quando comparado aos animais *naïve*, concordando com o que é encontrado na literatura relativo ao papel destas células no combate à infecção. O DTNB diminuiu o número de células inflamatórias no foco primário da infecção. Este resultado vai de encontro ao que muitos estudos trazem: a redução da migração de leucócitos para o foco primário piora o quadro séptico (ALVES-FILHO et al., 2005; CZAİKOSKI et al., 2013). Entretanto, é preciso levar em consideração que muitas dessas células inflamatórias que migram para o local da infecção são imaturas e apresentam um perfil de citocinas que podem tornar sua atividade ineficaz. Nessa situação, os leucócitos podem apresentar problemas no seu arsenal antimicrobiano como: autodegradação ou degradação por outras células de receptores essenciais, *downregulation* de receptores de superfície e ativação de vias não-resolutivas (revisado por LELIEFELD et al., 2013). Dentro deste contexto, a oxidação causada pelo DTNB pode ter preservado e regulado a ação das células de defesa, que tornaram o evento inflamatório mais eficaz e resolutivo, uma vez que existem evidências que modificações no sistema redox podem regular a atividade de neutrófilos (SAKAI et al., 2012; THOM et al., 2013). Por outro lado, o deslocamento para o lado redutor não modificou em nada o parâmetro de migração celular.

A diminuição da migração dos leucócitos para o parênquima pulmonar observada nesse estudo corrobora o resultado encontrado por

Benedet et al. (2018) que mostrou que o DTNB aumentou o número de leucócitos totais sanguíneos, atenuando a leucopenia causada pela sepse melhorando o estado global dos animais. Portanto, o DTNB parece regular o processo inflamatório, pois mesmo com a redução do número de células no foco primário, houve melhora do quadro geral talvez por um aumento compensatório nas capacidades fagocitária ou citotóxica dos neutrófilos.

As avaliações bioquímicas da composição do lavado broncoalveolar também dão suporte a essas conclusões. Animais sépticos apresentaram aumento na concentração dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) e aumento na concentração de proteínas extravasadas. Já quando os animais foram tratados com DTNB, as concentrações tanto do NOx quando das proteínas em geral diminuíram no lavado broncoalveolar. A redução local da concentração de NOx no grupo de animais tratados com DTNB significa que menos óxido nítrico está sendo produzido na região. É bem descrito na literatura que a disfunção orgânica que acontece na sepse é em parte dependente das altas concentrações de óxido nítrico que são produzidas pelas isoformas de sintase de óxido nítrico, principalmente pela NOS-2 (revisado por FERNANDES; ASSREUY, 2008). Já a concentração de proteínas diminuída no lavado broncoalveolar de animais tratados com DTNB indica que houve menos produção de exsudato, que indica uma resposta inflamatória menos intensa.

Tendo sido constatado que a modulação do ambiente redox induzida pela administração do DTNB teve efeito benéfico nos parâmetros inflamatórios e bioquímicos, foi avaliado qual seria a consequência disso no perfil de disseminação bacteriana, uma vez que a disseminação bacteriana a partir do foco primário da infecção para a corrente sanguínea e outros órgãos pode estar associada à mortalidade (USLAN et al., 2007; MEATHERAL et al., 2009).

O DTNB, apesar de não ter diminuído o número de UFC no foco primário da infecção (BAL) e nem no fígado, foi capaz de diminuir a bacteremia e o número de UFC no tecido cardíaco. Se esse efeito acontece por causa da ação direta da alteração do ambiente redox ou se isso é uma consequência da melhor efetividade do processo resolutivo da inflamação ainda precisa ser esclarecido. Entretanto, é preciso levar em consideração que em meio fisiológico o DTNB tem sua ponte dissulfeto rompida e seu produto assume carga (TNB<sup>-</sup>). Essa característica química garantiria à molécula uma polaridade que o impediria de atravessar membranas e penetrar profundamente nos tecidos. Portanto, uma possível explicação para essa ação positiva na

disseminação bacteriana pode ser pelo fato de que o DTNB tem sua ação primeiramente observada em estruturas do sistema cardiovascular ou sanguíneo, como endotélio e leucócitos, que são componentes fundamentais na resposta inflamatória e na defesa contra os agentes microbianos, regulando, assim, os parâmetros inflamatórios e de disseminação bacteriana.

O benefício da redução da disseminação bactérias no sangue e no principalmente no coração traz maiores chances de sobrevivência. Na clínica, muitos pacientes podem apresentar cardiomiopatia séptica. A disfunção do tecido cardíaco está entre as principais causas de óbito de pacientes com sepse e choque séptico (KUMAR et al., 2011). Quando as bactérias alcançam o tecido cardíaco elas promovem dano tecidual por liberação de proteases (BEAURFORT et al., 2011) e os neutrófilos do hospedeiro começam a formar redes extracelulares, ou NETs (do inglês, *neutrophil extracellular traps*), para tentar conter a infecção, mas isso acaba por favorecer ainda mais o dano tecidual (AUGUSTIN et al., 2013).

Os efeitos da oxidação pelo DTNB são evidentes nos parâmetros inflamatórios, bioquímicos e no perfil de disseminação bacteriana. Entretanto não está completamente claro se estes efeitos benéficos na sepse são efeitos direto da oxidação das sulfidrilas com mudança da atividade das proteínas ou alteração do estado redox com um efeito indireto na melhoria da inflamação como um processo resolutivo na sepse. Visando esclarecer um pouco o mecanismo pelo qual o DTNB age e avaliar a mudança no perfil do ambiente redox, foi utilizada a técnica do *Biotin Switch* para dosar nitrosotióis.

Quantificar mudanças no ambiente redox é uma tarefa difícil. Existem muitas variáveis que podem alterar o perfil redox de tióis proteicos e não-proteicos. Várias metodologias foram desenvolvidas para avaliar o grau de oxidação de sulfidrilas de um sistema: anticorpo anti-GSH para glutationilação de proteínas específicas; biotilação de ester etil glutationa (BioGEE) para detecção de glutationilação global (SULLIVAN et al., 2000); *Biotin switch* modificado, para quantificação de sulfuração (LU et al., 2013). Assim, a quantificação de nitrosotióis é uma das metodologias que podem dar indicativos do estado redox.

O ensaio do *Biotin Switch* foi desenvolvido por Jeffrey e colaboradores (2001) e foi modificado pelo nosso grupo (BENEDET et al., 2018). Baseia-se na especificidade do ascorbato para a redução de SNO. A Figura 14 traz fotomicrografias de pulmões de animais *naïve* e sépticos, tratados ou não com DTNB. Pode-se ver que existe uma nitrosilação basal no parênquima pulmonar, observada pelos níveis de

fluorescência dos cortes de animais *naïve*. De fato, a nitrosilação de proteínas e a sinalização que provém disso estão envolvidas em vários aspectos da biologia pulmonar (revisado por MAROZKINA; GASTON, 2015). Estudos mostram que nitrosotióis estão envolvidos na regulação de canais que interferem na hidratação das vias aéreas (MAROZKINA et al., 2010), frequência dos batimentos ciliares do epitélio das vias aéreas (LI et al., 2000) e na transcrição de genes regulados por concentração de oxigênio (PALMER et al., 2007). Animais *naïve* tratados com DTNB não apresentaram mudanças na intensidade de fluorescência, indicando que o DTNB não modifica a nitrosilação em níveis basais.

Ademais, os resultados deste trabalho mostram que no modelo de pneumosepse ocorre um aumento na quantidade de nitrosotióis no tecido pulmonar. Resultados anteriores do nosso laboratório sugerem que a formação de nitrosotióis estaria intrinsecamente ligada com algumas das principais características do choque séptico que são a hiporresponsividade a vasoconstritores e hipotensão (TERLUK, 2005; BENEDET et al., 2018). Além disso, LIU e colaboradores (2004) observaram que o aumento de SNO contribui par a mortalidade de animais endotoxêmicos (administração de LPS). Portanto, esta seria mais uma evidência do aumento da S-nitrosilação no processo da sepse.

Quando os animais sépticos foram tratados com DTNB, a fluorescência diminuiu, indicado a redução da oxidação de sulfidrilas pelo óxido nítrico. O mecanismo pelo qual o DTNB, um agente oxidante, induz a diminuição da oxidação de sulfidrilas por oxidantes endógenos ainda é desconhecido. Mas é importante evidenciar que nitrosotióis podem funcionar como reservatórios de óxido nítrico, fazendo com que essa molécula altamente reativa, com uma meia vida de 2 - 30 segundos, continue fazendo efeito mesmo quando os níveis das sintases de óxido nítrico estão com a expressão diminuída (revisado por ASSREUY, 2006).

Além disso, alguns estudos sugerem que após o rompimento da ponte dissulfeto do DTNB ao reagir com sulfidrilas, aconteceria a formação de uma estrutura contendo o dissulfeto misto (SH proteico ou não-proteico conjugado a uma molécula de TNB<sup>-</sup>) e uma molécula de TNB<sup>-</sup> livre. Esta última poderia se ligar ao óxido nítrico, agindo como um sequestrador desta molécula (GERGEL; CARNABAUM, 1997) e diminuindo a formação de nitrosotióis durante a sepse. Portanto, uma possível explicação seria que o DTNB está reduzindo esses reservatórios, diminuindo a nitrosilação exacerbada que acontece na sepse e melhorando o estado dos animais.

Por fim, como o DTNB induziu melhora substancial nos parâmetros inflamatórios, bioquímicos, bacterianos, além de modular o ambiente redox ao diminuir a quantidade de nitrosotióis, foi realizada a avaliação da sobrevivência dos animais. Como esperado, o DTNB reduziu a mortalidade dos animais. Além disso, de maneira muito interessante, o DTT, apesar de não ter tido efeito quando administrado sozinho, foi capaz de reverter o efeito benéfico do DTNB quando administrado uma hora após o DTNB. Isso indica que, depois que o DTNB agir, se as sulfidrilas forem regeneradas pelo DTT, isso possibilitaria, talvez, novos sítios para formação de novas formas oxidadas que são mais prejudiciais. De fato, uma das hipóteses que também pode ser elencada é que, por vezes, a oxidação reversível de aminoácidos pode funcionar como proteção contra oxidações irreversíveis que normalmente levam a perturbações nas funções celulares e morte celular através de prejuízos na função das proteínas (revisado por MILLER; MIEYAL, 2015).

Diante de todas essas evidências, concluímos que, pelo menos em parte, a hipótese do trabalho é verdadeira pois o DTNB melhorou todos os parâmetros avaliados. Entretanto, o DTT não piorou nenhum dos parâmetros, pelo menos nas doses, tempo e via de administração utilizados. Uma possível explicação para a falta de efeito é que o critério de escolha de dose e tempo de administração foi baseado no esquema do DTNB, já que foi o primeiro estudo que foi tentada essa abordagem. Rosa, Dafre e Rodrigues (2013) que atestaram que o DTNB apresentava um efeito *antidepressant-like* e que o DTT na dose de 25 mg/kg (equivalente a 157  $\mu\text{mol/kg}$ , por via intraperitoneal) foi capaz de reverter esse efeito. A dose utilizada no estudo supracitado foi próxima à utilizada neste trabalho. Mas ainda assim, muitas variáveis são diferentes, como o modelo experimental, via de administração e tempo de tratamento. Portanto, não podemos concluir que a redução das sulfidrilas não tem efeito no processo séptico, pois seriam necessário mais experimentos para achar um esquema de doses adequado.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que o deslocamento do ambiente redox para a oxidação:

- 1 - Reduz a formação de edema pulmonar num quadro de sepse;
- 2 - Diminui a migração de leucócitos para o foco primário, mas favorece o processo inflamatório resolutivo;
- 3 - Leva à diminuição da produção local do óxido nítrico no pulmão;
- 4 - Diminui a produção de exsudato no pulmão;
- 5 - Diminui a disseminação bacteriana no sistema cardiovascular;
- 6 - Reduz a formação de nitrosotióis em quadro séptico
- 7 - Reduz a mortalidade dos animais submetidos à pneumosepse
- 8 - Tem seu efeito protetor na mortalidade revertido pela redução das sulfidrilas pelo DTT.

Por outro lado, um ambiente reduzido (pela administração de DTT) não alterou o curso das respostas. Isto pode significar, em uma perspectiva mais ampla, que o ambiente redox fisiológico já está em posição máxima no que se refere ao aspecto redutor.

## REFERÊNCIAS

AIZENMAN, Elias; LIPTON, Stuart A.; LORING, Ralph H.. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. **Neuron**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.1257-1263, mar. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90310-3](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(89)90310-3).

ALBERTI, Corinne et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive care medicine**, v. 28, n. 2, p. 108-121, 2002.

ALVES-FILHO, José Carlos et al. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.223-226, mar. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762005000900038>.

ANDRIOPOULOU, Paraskevi et al. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s.l.], v. 19, n. 10, p.2286-2297, 1 out. 1999.

ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. *Critical Care Medicine*, 29(7): 109-16, 2001.

ANGUS, Derek C.; POLL, Tom van Der. Severe Sepsis and Septic Shock. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 369, n. 9, p.840-851, 29 ago. 2013. *New England Journal of Medicine (NEJM/MMS)*. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1208623>.

ASSREUY, Jamil. Nitric Oxide and Cardiovascular Dysfunction in Sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-drug Targets**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.165-173, 1 jun. 2006. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/187153006777442314>.

AUGUSTIN, Pascal et al. Predominant Role of Host Proteases in Myocardial Damage Associated with Infectious Endocarditis Induced by *Enterococcus faecalis* in a Rat Model. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 81, n. 5, p.1721-1729, 11 mar. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00775-12>.



BEALE, R et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. **Infection** v. 37, n. 3, p. 222-232, jun. 2009.

BEAUFORT, Nathalie et al. The thermolysin-like metalloproteinase and virulence factor LasB from pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* induces anoikis of human vascular cells. **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 13, n. 8, p.1149-1167, 25 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01606.x>.

BENEDET, Patrícia O. et al. The therapeutic value of protein (de) nitrosylation in experimental septic shock. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 1, p. 307-316, 2018.

BISWAS, Saibal; CHIDA, Asiya Seema; RAHMAN, Irfan. Redox modifications of protein–thiols: Emerging roles in cell signaling. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 71, n. 5, p.551-564, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.044>.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 136, n. 5 Suppl, 2009, 1992.

BORREGAARD, Niels. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.657-670, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>.

BROWN, Ka et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **The Lancet**, [s.l.], v. 368, n. 9530, p.157-169, jul. 2006. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)69005-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(06)69005-3).

BUETTNER, Garry R.. Superoxide Dismutase in Redox Biology: The Roles of Superoxide and Hydrogen Peroxide. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.341-346, 1 maio 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/187152011795677544>.

BURAS, Jon A.; HOLZMANN, Bernhard; SITKOVSKY, Michail. Animal Models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 4, n. 10, p.854-865, out. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1854>.

CAI, S.; SAUVÉ, R.. Effects of Thiol-Modifying Agents on a K(Ca 2+ ) Channel of Intermediate Conductance in Bovine Aortic Endothelial Cells. **Journal Of Membrane Biology**, [s.l.], v. 158, n. 2, p.147-158, 15 jul. 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s002329900252>.

CAIRUS, Henrique F.; RIBEIRO JR, Wilson A. **Textos hipocráticos: o doente, o médico e a doença**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2005.

CIRCU, Magdalena L.; AW, Tak Yee. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.749-762, 15 mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>.

CINEL, Ismail; OPAL, Steven M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Critical care medicine**, v. 37, n. 1, p. 291-304, 2009.

CLELAND, W. W.. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups\*. **Biochemistry**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.480-482, abr. 1964. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00892a002>.

CZAIKOSKI, Paula Giselle et al. Heme Oxygenase Inhibition Enhances Neutrophil Migration Into the Bronchoalveolar Spaces and Improves the Outcome of Murine Pneumonia-Induced Sepsis. **Shock**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.389-396, abr. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/shk.0b013e31828bbcf9>.

DE BACKER, Daniel et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine** [s.l.], v. 166, n. 1, p.98-104, 2002.

DEUTSCHMAN, Clifford S.; TRACEY, Kevin J. Sepsis: current dogma and new perspectives. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 463-475, 2014.

- ELLMAN, George L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, [s.l.], v. 82, n. 1, p.70-77, 1959
- ESMON, C.T.. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis?. **Crit Care Med**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.S219-22, 2004.
- FERNANDES, Daniel; ASSREUY, Jamil. Nitric Oxide and Vascular Reactivity in Sepsis. **Shock**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.10-13, out. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).  
<http://dx.doi.org/10.1097/shk.0b013e3181818518>.
- FIGUEIREDO-PEREIRA, E et al. Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 273, n. 21, p.12703-12709, 1998.
- FINKEL, Toren. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion In Cell Biology**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.247-254, abr. 2003. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00002-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00002-4).
- GHEZZI, Pietro. Protein glutathionylation in health and disease. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1830, n. 5, p.3165-3172, maio 2013. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.009>.
- GO, Young-mi; JONES, Dean P.. Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.495-509, fev. 2011. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.029>.
- GOITRE, Luca et al. Up-regulation of NADPH oxidase-mediated redox signaling contributes to the loss of barrier function in KRIT1 deficient endothelium. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-12, 15 ago. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08373-4>.
- GUEQUÉN, Anita et al. S-nitrosylation regulates VE-cadherin phosphorylation and internalization in microvascular permeability. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 310, n. 8, p. H1039-H1044, 2016.

HAN, Jingyan et al. The redox mechanism for vascular barrier dysfunction associated with metabolic disorders: Glutathionylation of Rac1 in endothelial cells. **Redox Biology**, [s.l.], v. 9, p.306-319, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.003>.

HESS, Douglas T. et al. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.150-166, fev. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1569>.

HOREWICZ, Verônica Vargas et al. FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 746, p.267-273, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.11.026>.

HOTCHKISS, Richard S.; MONNERET, Guillaume; PAYEN, Didier. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 12, p. 862, 2013.

HOTCHKISS, R. S.; MOLDAWER, L. L., OPAL, S. M.; et al. Sepsis and septic shock. *Nature Reviews Disease Primers*, 30(2):16045, 2016.

ILAS, Instituto Latino Americano Para Estudos da Sepse. **Sepse: Um problema de saúde pública**. Brasília: Conselho Federal de Medicina, 2015.

IYER, Smita S. et al. Cysteine Redox Potential Determines Pro-Inflammatory IL-1 $\beta$  Levels. **Plos One**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.e5017, 27 mar. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005017>.

IYER, Smita S. et al. Oxidation of extracellular cysteine/cystine redox state in bleomycin-induced lung fibrosis. **American Journal Of Physiology-lung Cellular And Molecular Physiology**, [s.l.], v. 296, n. 1, p.L37-L45, jan. 2009. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.90401.2008>.

JAFFREY, S. R.; SNYDER, S. H.. The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins. **Science Signaling**, [s.l.], v. 2001,

n. 86, p.1, 12 jun. 2001. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/stke.2001.86.p11>.

JAFFREY, Samie R. et al. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. **Nature Cell Biology**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.193-197, fev. 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/35055104>.

JANSSEN-HEININGER, Yvonne M.w. et al. Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.1-17, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.011>.

KING, Elizabeth G et al. Pathophysiologic mechanisms in septic shock. **Laboratory Investigation**, [s.l.], v. 94, n. 1, p.4-12, 23 set. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2013.110>.

KUMAR, Anand et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock\*. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 34, n. 6, p.1589-1596, jun. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.ccm.0000217961.75225.e9>.

KUMAR, Himanshu; KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. **International Reviews Of Immunology**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.16-34, jan. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul; ASTER, Jon (Ed.). **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. 9. ed. Amsterdã: Elsevier, 2014. 1408 p.

LAUGHLIN, T.M.; KITTO, K.F.; WILCOX, G.L.. Redox manipulation of NMDA receptors in vivo: alteration of acute pain transmission and dynorphin-induced allodynia. **Pain**, [s.l.], v. 80, n. 1-2, p.37-43, 1999.

LELIEFELD, Pieter H. C. et al. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. **Critical Care**, [s.l.], v. 20, n. 1, 23 mar. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-016-1250-4>.

LELIEFELD, Pieter H. C. et al. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. **Critical Care**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.73, 23 mar. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-016-1250-4>.

LI, Dechun et al. Regulation of Ciliary Beat Frequency by the Nitric Oxide–Cyclic Guanosine Monophosphate Signaling Pathway in Rat Airway Epithelial Cells. **American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.175-181, ago. 2000. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1165/ajrcmb.23.2.4022>.

LIU, Yanping; GUTTERMAN, David D. Oxidative Stress And Potassium Channel Function. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.305-311, abr. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03649.x>.

LONG, Li-hong et al. Differential Effects of Methionine and Cysteine Oxidation on  $[Ca^{2+}]_i$  in Cultured Hippocampal Neurons. **Cellular And Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.7-15, 25 jun. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-008-9289-7>.

LU, Changyuan et al. S-sulfhydration/desulfhydration and S-nitrosylation/denitrosylation: A common paradigm for gasotransmitter signaling by H<sub>2</sub>S and NO. **Methods**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.177-181, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.05.020>.

LUNDBERG, J. M. Vagal substance P nerves involved in control of vascular permeability and smooth muscle tone in trachea and bronchi. **Br J Pharmacol**, [s.l.], v. 77, p.441P, 1982.

MACHADO, Flavia R et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 17, n. 11, p.1180-1189, nov. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30322-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30322-5).

MAROZKINA, N. V. et al. Hsp 70/Hsp 90 organizing protein as a nitrosylation target in cystic fibrosis therapy. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 25, p.11393-11398, 8

jun. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0909128107>.

MAROSKINA, Nadzeya V.; GASTON, Benjamin. Nitrogen Chemistry and Lung Physiology. **Annual Review Of Physiology**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.431-452, 10 fev. 2015. Annual Reviews.  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170352>.

MARTÍNEZ-RUIZ, Antonio et al. Specificity in S-Nitrosylation: A Short-Range Mechanism for NO Signaling?. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 19, n. 11, p.1220-1235, 10 out. 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.5066>.

MATTEUCCI, Elena; GIAMPIETRO, Ottavio. Thiol Signalling Network with an Eye to Diabetes. **Molecules**, [s.l.], v. 15, n. 12, p.8890-8903, 6 dez. 2010. MDPI AG.  
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules15128890>.

MAYR, F B et al. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. **The Journal of the American Medical Association** v. 303, n. 24, p. 2495-2503 , 23 jun. 2010.

MEATHERALL, Bonnie L. et al. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of Klebsiella pneumoniae Bacteremia. **The American Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 122, n. 9, p.866-873, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.03.034>.

MENG, Tzu-ching; FUKADA, Toshiyuki; TONKS, Nicholas K. Reversible Oxidation and Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases In Vivo. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.387-399, fev. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00445-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00445-8).

MILLER, Olga Gorelenkova; MIEYAL, John J.. Sulfhydryl-mediated redox signaling in inflammation: role in neurodegenerative diseases. **Archives Of Toxicology**, [s.l.], v. 89, n. 9, p.1439-1467, 1 abr. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-015-1496-7>.

NAMAS, R. et al. Sepsis: Something Old, Something New, and a Systems View. **Critical Care**, 27(3): 314.e1–314.e11, 2012.

NEDOSPASOV, A. et al. An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 97, n. 25, p.13543-13548, 28 nov. 2000. Proceedings of the National Academy of Sciences.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.250398197>.

PAHL, Heike L. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. **Oncogene**, [s.l.], v. 18, n. 49, p.6853-6866, nov. 1999. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1203239>.

PETTIGREW, Christopher A. A defining time for sepsis. **Trends in molecular medicine**, v. 20, n. 4, p. 191, 2014.

POOLE, Leslie B.; KARPLUS, P. Andrew; CLAIBORNE, Al. Protein Sulfenic Acids in Redox Signaling. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.325-347, 10 fev. 2004. Annual Reviews.  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121735>.

PRABHU, A. et al. Cysteine Catabolism: A Novel Metabolic Pathway Contributing to Glioblastoma Growth. **Cancer Research**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.787-796, 18 dez. 2013. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-1423>.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. Sepsis: still going strong. *Archives of Medical Research*, 36(6): 672-81, 2005.

RAWSON, Ruth A.. The Binding of the T-1824 and Structurally Related Diazo By the Plasma Proteins. **American Journal Of Physiology-legacy Content**, [s.l.], v. 138, n. 5, p.708-717, abr. 1943. American Physiological Society.  
<http://dx.doi.org/10.1152/ajplegacy.1943.138.5.708>.

RAZAVI, Habib M. et al. Pulmonary Neutrophil Infiltration in Murine Sepsis. **American Journal Of Respiratory And Critical Care**



**Medicine**, [s.l.], v. 170, n. 3, p.227-233, ago. 2004. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200306-846oc>.

RHEE, S. G.. CELL SIGNALING: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a Necessary Evil for Cell Signaling. **Science**, [s.l.], v. 312, n. 5782, p.1882-1883, 30 jun. 2006. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1130481>.

RHEE, S. G. et al. Hydrogen Peroxide: A Key Messenger That Modulates Protein Phosphorylation Through Cysteine Oxidation. **Science Signaling**, [s.l.], v. 2000, n. 53, p.PE1-PE1, 10 out. 2000. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/stke.2000.53.pe1>.

RIDDLES, Peter W.; BLAKELEY, Robert L.; ZERNER, Burt. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 94, n. 1, p.75-81, abr. 1979. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90792-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(79)90792-9).

ROSA, Juliana M.; DAFRE, Alcir Luiz; RODRIGUES, Ana Lúcia S.. Antidepressant-like responses in the forced swimming test elicited by glutathione and redox modulation. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 253, p.165-172, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.009>.

ROSENTHAL, Víctor Daniel et al. International Nosocomial Infection Control Consortiu (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. Device-associated module. **American Journal Of Infection Control**, [s.l.], v. 42, n. 9, p.942-956, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2014.05.029>.

SHANKAR-HARI, Manu et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 775-787, 2016.

SAKAI, Jiro et al. Reactive Oxygen Species-Induced Actin Glutathionylation Controls Actin Dynamics in Neutrophils. **Immunity**,

[s.l.], v. 37, n. 6, p.1037-1049, dez. 2012. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.017>.

SCHAFER, Freya Q.; BUETTNER, Garry R.. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 30, n. 11, p.1191-1212, jun. 2001. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00480-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00480-4).

SCHWECHHEIMER, Carmen; KUEHN, Meta J.. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 13, n. 10, p.605-619, out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3525>.

SERES, Tamas. et al. Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational modification with potential for buffering the effects of oxidant stress. **The Journal of Immunology**, [s.l.], v. 156, n. 5, p.1973-1980, 1996.

SERHAN, Charles N; SAVILL, John. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, [s.l.], v. 6, n. 12, p.1191-1197, dez. 2005. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ni1276>.

SEYMOUR, Christopher W. et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 762-774, 2016.

SHANLEY, Thomas P; WARNER, Roscoe L; A WARD, Peter. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. **Molecular Medicine Today**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.40-45, abr. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/1357-4310\(95\)80019-0](http://dx.doi.org/10.1016/1357-4310(95)80019-0).

SHERWOOD, Edward R.; TOLIVER-KINSKY, Tracy. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SINGER, Mervyn et al. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. **The Lancet**, v. 364, n. 9433, p. 545-548, 2004.

SINGER, M *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **The Journal of the American Medical Association** v. 315, n. 8, p. 801-810, 23 fev. 2016.

SOARES, Marcio et al. Organizational characteristics, outcomes, and resource use in 78 Brazilian intensive care units: the ORCHESTRA study. **Intensive Care Medicine**, [s.l.], v. 41, n. 12, p.2149-2160, 28 set. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-015-4076-7>.

SORDI, Regina et al. Dual role of lipoxin A4 in pneumosepsis pathogenesis. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.283-292, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.010>.

SORDI, Regina et al. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **International Journal Of Experimental Pathology**, [s.l.], v. 94, n. 2, p.144-155, 27 fev. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/iep.12016>.

STEARNS-KUROSAWA, Deborah J. et al. The Pathogenesis of Sepsis. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.19-48, 28 fev. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130327>.

STEINWALL, Oskar; KLATZO, Igor. Selective Vulnerability of the Blood-Brain Barrier in Chemically Induced Lesions\*. **Journal Of Neuropathology & Experimental Neurology**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.542-559, out. 1966. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-196610000-00004>.

SULLIVAN, Daniel M. et al. Identification of Oxidant-Sensitive Proteins: TNF- $\alpha$  Induces Protein Glutathiolation. **Biochemistry**, [s.l.], v. 39, n. 36, p.11121-11128, set. 2000. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi0007674>.

TERLUK, M. R.. **Espostas vasculares mediadas pelo óxido nítrico: Efeitos de agentes oxidantes na hiporreatividade à fenilefrina e no relaxamento induzido por tióis**. 2005. 142 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

TETIK, Sermin et al. Determination of oxidant stress in plasma of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis patients. **Indian Journal Of Biochemistry And Biophysics**, Nova Delhi, v. 47, n. 1, p.353-358, dez. 2010.

THOM, Stephen R. et al. Nitric-oxide Synthase-2 Linkage to Focal Adhesion Kinase in Neutrophils Influences Enzyme Activity and  $\beta$ 2Integrin Function. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 288, n. 7, p.4810-4818, 6 jan. 2013. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).  
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m112.426353>.

TORCHINSKY, y M. **Sulfur in proteins**. Oxford: Pergamon Press, 1977. Tradução de: W Wittenberg.

TSIOTOU, Adelais G. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. **Medical Science Monitor**, [s.l.], v.11, n. 3, p.RA76-RA85, 2005.

USLAN, Daniel Z.. Age- and Sex-Associated Trends in Bloodstream Infection. **Archives Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 167, n. 8, p.834, 23 abr. 2007. American Medical Association (AMA).  
<http://dx.doi.org/10.1001/archinte.167.8.834>.

VESTWEBER, Dietmar; BROERMANN, Andre; SCHULTE, Dörte. Control of endothelial barrier function by regulating vascular endothelial-cadherin. **Current Opinion In Hematology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.230-236, maio 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).  
<http://dx.doi.org/10.1097/moh.0b013e328338664b>.

VINCENT, J. -I. et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. **Intensive Care Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 7, p.707-710, jul. 1996. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1007/bf01709751>.

WANG, Le Feng et al. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Pulmonary Microvascular Protein Leak in Murine Sepsis. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 165, n.

12, p.1634-1639, 15 jun. 2002. American Thoracic Society.  
<http://dx.doi.org/10.1164/rccm.2110017>.

WANG, Lefeng et al. Specific Role of Neutrophil Inducible Nitric Oxide Synthase in Murine Sepsis-Induced Lung Injury In Vivo. **Shock**, [s.l.], v. 37, n. 5, p.539-547, maio 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/shk.0b013e31824dcb5a>.

ZHU, Weiyan et al. Interleukin receptor activates a MYD88–ARNO–ARF6 cascade to disrupt vascular stability. **Nature**, [s.l.], v. 492, n. 7428, p.252-255, 11 nov. 2012. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature11603>.