



DÉBORA JULIANA DOS ANJOS TANGERINO

**EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA NO QUADRO INFLAMATÓRIO E NA REATIVIDADE
PLAQUETÁRIA NA SEPSE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
LIPOPOLISSACARÍDEO**

Orientadora: Profa. Dra Sisi Marcondes Paschoal

**Campinas
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

DÉBORA JULIANA DOS ANJOS TANGERINO

**EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA NO QUADRO INFLAMATÓRIO E NA REATIVIDADE
PLAQUETÁRIA NA SEPSE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
LIPOPOLISSACARÍDEO**

**Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Farmacologia.**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
DÉBORA JULIANA DOS ANJOS TANGERINO,
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SISI
MARCONDES PASCHOAL.

Assinatura do Orientador

Campinas

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

T156e Tangerino, Débora Juliana dos Anjos, 1987-
 Efeito da N-acetilcisteína no quadro inflamatório e na reatividade plaquetária
 na sepse experimental induzida por lipopolissacarídeo / Débora Juliana dos Anjos
 Tangerino. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

 Orientador: Sisi Marcondes Paschoal.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
 Ciências Médicas.

 1. Plaquetas. 2. Lipopolissacarídeos. 3. N-acetilcisteína. I. Paschoal, Sisi
 Marcondes, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
 Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of N-acetylcysteine in the inflammatory and platelet reactivity in experimental sepsis induced by lipopolysaccharide

Palavras-chave em inglês:

Platelet

Lipopolyssacarides

N-acetylcysteine

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Sisi Marcondes Paschoal [Orientador]

Joyce Maria Annichino Bizzacchi

Angelina Zanesco

Data de defesa: 29-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

DÉBORA JULIANA DOS ANJOS

ORIENTADORA: PROF. DR. SISI MARCONDES PASCHOAL

MEMBROS:

1. PROF. DR. SISI MARCONDES PASCHOAL

Sisi Marcondes Paschoal

2. PROF. DR. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

Joyce Maria Annichino Bizzacchi

3. PROF. DR. ANGELINA ZANESCO

Angelina ZanESCO

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29 de agosto de 2013

Dedicatória

À Deus dedico o meu agradecimento maior, porque têm sido tudo em minha vida.

Aos meus queridos pais Edna e Ricardo, que me trouxeram com todo o amor e carinho a este mundo, por abriram mão de seus desejos e sonhos para que eu chegasse até aqui.

Ao meu esposo Ewerton que sempre me apoiou e me ajudou nos momentos difíceis.

Às minhas irmãs e amigas Daniela e Rebeca que sempre estiveram presente na minha vida, dando alegria e apoio.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal, agradeço imensamente pela confiança e a oportunidade de desenvolver este trabalho, por sua orientação e todo o crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pelo apoio, pelo laboratório e ensinamentos.

Aos meus colegas Carol, Gisele, Maria Elisa, Nádia e Pedro, que me ajudaram nos experimentos e com os quais eu desenvolvi uma grande amizade.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP pelos serviços prestados e a convivência.

A todos os meus familiares por toda amizade e compreensão.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Mestrado.

“A esperança é um alimento da nossa alma, ao qual se mistura sempre o veneno do medo.”

François-Marie Arquet Voltaire

SUMÁRIO

LISTA DE MATERIAIS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Sepses.....	15
1.2 Lipopolissacarídeo.....	16
1.2.1 Lipopolissacarídeo, Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio e enzimas antioxidantes.....	16
1.3 Plaquetas.....	18
1.3.1 Plaquetas e Sepses.....	19
1.3.2 Plaquetas e Espécies reativas.....	19
1.4 Antioxidante N-acetilcisteína.....	20
1.4.1 N-acetilcisteína e sepses.....	21
2. Justificativa e relevâncias.....	22
3. Objetivo.....	23
3.1 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Animais.....	24
4.2 Grupos experimentais.....	24
4.3 Contagem total e diferencial de leucócitos.....	24
4.4 Contagem de plaquetas do sangue total	25
4.5 Determinação de TNF- α	25
4.6 Obtenção de plaquetas lavadas.....	25
4.7 Agregação plaquetária.....	25
4.8 Determinação de GMPc.....	25
4.9 Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por citometria de fluxo.....	26
4.10 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	27
4.11 Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx).....	27
4.12 Determinação da atividade da Glutathione Redutase (GR).....	27
4.13 Análise estatística.....	28

5. RESULTADOS.....	28
5.1 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) sobre o número de leucócitos, neutrófilos e linfócito de ratos tratados com LPS.....	29
5.2 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) sobre a concentração de TNF-α no plasma de ratos tratados com LPS.....	30
5.3 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) no número de plaquetas circulantes e na agregação plaquetária	32
5.4 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) na formação de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS	35
5.5 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plaquetas de ratos tratados com LPS.....	36
5.6 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) em plaquetas de ratos tratados com LPS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

Lista de Materiais

Substância

Procedência

ADP	Sigma-Aldrich(St. Luis, MO, EUA)
DCFH-DA	Sigma- Aldrich (St. Luis, MO, EUA)
Kit GMPc	Cayman (Michigan, EUA)
Kit GPx	Cayman (Michigan, EUA)
Kit GR	Cayman (Michigan, EUA)
Kit SOD	Cayman (Michigan, EUA)
Kit TNF-α	BioLegend (San Diego, CA)
LPS	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO,EUA)
N-acetilcisteína	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EUA)

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenosina di-fosfato
ATP	Adenosina trifosfato
COX-1	Cicloxygenase-1
COX-2	Cicloxygenase-2
DCFH-DA	2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
IBMX	Adenosina 3-isobutil-1-metil-xantina
IP3	Inositol trifosfato
GC	Guanilil ciclase
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GP1Ib/IIla	Glicoproteína IIb/IIla
GPx	Glutational peroxidase
GRx	Glutational redutase
GSH	Glutational reduzida
GSSG	Glutational oxidada
LPS	Lipopolissacarídeo
NO	Óxido Nítrico
c-NOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
e-NOS	Óxido nítrico sintase endotelial
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
PAF	Fator de ativação Plaquetária
RNS	Espécie reativa de nitrogênio
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SOD	Superóxido desmutase

Lista de Figuras

Figura 1: Efeito de NAC sobre o número de leucócitos totais no sangue periférico de ratos injetados com LPS.

Figura 2: Efeito de NAC sobre a porcentagem de neutrófilos e linfócitos em sangue periférico de ratos injetados com LPS.

Figura 3: Efeito de NAC sobre a concentração de TNF- α em plasma de ratos injetados com LPS.

Figura 4: Efeito de NAC sobre o número de plaquetas em sangue periférico de ratos injetados com LPS.

Figura 5: Efeito de NAC na agregação plaquetária de ratos injetados com LPS.

Figura 6: Efeito de NAC nos níveis intraplaquetários de GMPc de ratos injetados com LPS.

Figura 7: Efeito de NAC na geração de ROS em plaquetas lavadas de ratos injetados com LPS.

Figura 8: Efeito de NAC na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em plaquetas lavadas de ratos injetados com LPS.

Figura 9: Efeito de NAC na atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx) e da glutathione reductase (GR) em plaquetas lavadas de ratos injetados com LPS.

Resumo

A sepse caracteriza-se por uma reação inflamatória sistêmica e um quadro de estresse oxidativo em decorrência da grande formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Há trabalhos que mostram que as plaquetas são importantes neste quadro inflamatório, mas seu verdadeiro papel na sepse ainda não está bem elucidado. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito temporal do uso do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) na resposta inflamatória e na atividade plaquetária em modelo de sepse induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Para tanto, ratos controle foram injetados com salina (300 µl, i.p.) ou NAC (150 mg/kg, i.p.), enquanto os tratados foram injetados com LPS de *E. coli* (1 mg/kg, i.p.) ou com NAC 30 min ou 6h após a injeção de LPS. Após 48h da injeção de LPS o sangue foi coletado. O número de leucócitos totais e plaquetas foi determinado no sangue periférico. A concentração plasmática de TNF-α foi determinada utilizando kit comercial de ELISA. A agregação plaquetária foi avaliada em agregômetro de dois canais. A determinação de EROs em plaquetas foi feita por citometria de fluxo e a de GMPc por imunoensaio. A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), glutational peroxidase (GPx) e glutational redutase (GR) foi feita através de kits comerciais. O LPS aumentou o número de leucócitos totais e reduziu o de plaquetas no sangue periférico. A NAC, 30 min ou 6h após a injeção de LPS, levou a contagem destas células para números semelhantes ao do grupo injetado com salina ou somente com NAC. A concentração plasmática aumentada de TNF-α nos ratos injetados com LPS foi reduzida por NAC para valores próximos aos encontrados no grupo salina. A agregação plaquetária induzida por ADP (10 µ) não foi afetada por NAC, mas foi 50% menor em ratos tratados com LPS. A inibição da agregação plaquetária foi revertida pela injeção de NAC 30 min ou 6h após a injeção de LPS. O LPS aumentou 2,2 vezes os níveis de GMPc em plaquetas estimuladas com ADP quando comparado com o grupo injetado com salina, o qual foi prevenido por NAC, quer em 30 min ou 6h após a injeção de LPS. Os níveis de GMPc em plaquetas de ratos injetados com NAC foram 45% menores do que os do grupo salina. A produção aumentada de EROs em plaquetas ativadas de ratos injetados com LPS foi reduzida por NAC para níveis semelhantes aos dos controle. A NAC reduziu significativamente a formação de EROs

em plaquetas em comparação com o grupo salina. A atividade enzimática da SOD em plaquetas ativadas foi reduzida em 35% por NAC em comparação com o grupo salina. O LPS aumentou, discretamente, a atividade da SOD em plaquetas, sendo este prevenido pelo tratamento com NAC. Diferente do observado com SOD, as atividades enzimáticas da GPx e da GR em plaquetas ativadas foram significativamente aumentadas pelo LPS. A NAC não modificou a atividade da GPx e da GR em comparação com o grupo salina, mas reduziu cerca de 41% e 61% a atividade da GPx e GR, respectivamente, em plaquetas do grupo injetado com LPS. Nossos resultados mostraram que a NAC previne e reverte os efeitos do tratamento de ratos com LPS na atividade plaquetária. O restabelecimento da agregação plaquetária, dos níveis de GMPc e EROs intraplaquetário podem ter sido resultado de uma ação direta de NAC nas plaquetas e/ou em decorrência da melhora do quadro inflamatório do animal.

Abstract

Sepsis is an oxidative stress condition characterized by a systemic inflammatory reaction. It has been demonstrated that platelets are important in this inflammatory condition, but their real role in sepsis has not been well elucidated yet. Therefore, the aim of this study was to evaluate the temporal effect of the use of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) in the inflammatory response and platelet activity in a model of sepsis induced by lipopolysaccharide (LPS). Control rats were injected with saline (300 μ l, i.p.) or NAC (150 mg/kg, i.p.), while those treated were injected with LPS from *E. coli* (1 mg/kg, i.p.) or with NAC 30 min or 6 h after LPS injection. Blood was collected 48 h after LPS injection. Total leukocytes and platelets number was determined in peripheral blood. The plasma concentration of TNF- α was determined using commercial ELISA kit. Platelet aggregation was measured in two-channel aggregometer. Determination of reactive oxygen species (ROS) in platelets was performed by flow cytometry and cGMP by immunoassay. Enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) was determined using commercial kits. LPS increased the total leukocytes number and reduced platelets in peripheral blood. NAC, 30 min or 6 h after LPS injection, brought the cell counts to the similar values of rats injected with saline or with NAC. The increased plasma concentrations of TNF- α in rats injected with LPS was reduced by NAC to values close to those found in the saline group. ADP (10 μ M)-induced platelet aggregation was unaffected by NAC but was 50% lower in rats treated with LPS. Inhibition of platelet aggregation was reversed by the injection of NAC 30 min or 6 h after LPS injection. LPS increased intraplatelet cGMP levels by 2.2-fold compared to the group injected with saline, which was prevented by NAC either 30 min or 6 hours after LPS injection. cGMP levels in activated platelets of rat injected with NAC were 45% lower than those of the saline group. The increased production of ROS in activated platelets from rat injected with LPS was reduced by NAC to levels similar to the control. NAC significantly reduced the formation of ROS in platelets compared to the saline group. SOD activity in stimulated platelets was reduced 35% by NAC compared to the saline group. LPS slightly increased SOD activity in platelets, which is prevented by treatment with NAC. Different from that

observed with SOD, the enzyme activities of GPx and GR in activated platelets were significantly increased by LPS. The NAC did not modify the activity of GPx and GR compared with the saline group, but decreased by 41% and 61% the GPx and GR activities, respectively, in platelets of LPS-injected group. Our results showed that NAC prevents and reverses the effects of in vivo LPS on platelet activity. Restoration of platelet aggregation and of intraplatelet cGMP and ROS levels of LPS-injected rats may be caused by a direct action of NAC in platelets or by the improvement of inflammatory condition in the animal.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sepses

A sepsis é definida como uma resposta inflamatória sistêmica decorrente da reação do sistema imunológico à infecção, podendo ser causada por vírus, fungos ou, como mais comumente ocorre, por bactérias (Bochud *et al*, 2006; Vandijck *et al*, 2003). É um problema sério e frequente que ocorre em hospitais de todas regiões do Brasil e é de difícil controle, seja porque os agentes infecciosos estão cada vez mais resistentes aos antibióticos ou pela escassez de alternativa medicamentosa para controlar as complicações apresentadas na sepsis (O'Brien, 2007).

A taxa de mortalidade pela sepsis é alta, sendo a segunda maior causa de morte nas unidades de tratamento intensivo (Marshall *et al*, 2005). Em 2011, segundo dados do DATASUS, ocorreram 80.758 internações para tratamento da sepsis no SUS, sendo que 41,58% destes pacientes vieram a óbito (DATASUS, 2011).

De modo geral, a sepsis caracteriza-se por diminuição da atividade cardiocirculatória resultante da liberação de agentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO), cininas, prostaglandinas e citocinas e também pela redução simultânea do débito cardíaco. Dessa forma, há o colapso do sistema vascular, quadro típico do choque séptico, que é caracterizado ainda por sinais bioquímicos de déficit de oxigênio, danos vasculares e coagulação intravascular disseminada. A diminuição da pressão arterial e da perfusão tecidual, somada à reação inflamatória, acaba gerando danos funcionais nos sistemas renal, hepático e pulmonar, que podem culminar na disfunção múltipla de órgãos (Brandtzaeg, 1996; Karima *et al*, 1999).

Os sinais e sintomas que os clínicos utilizam para diagnosticar um paciente com septicemia são pelo menos um destes: temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$, batimentos cardíacos acima de 90 batimentos/min, taquipnéia (>20 respirações/min) ou hiperventilação ($\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$), alteração no número de leucócitos circulantes (>12.000 células/mm³ ou <4000 células/mm³) e trombocitopenia (Dellinger *et al*, 2013). Este último é um marcador importante, pois o número de plaquetas acumuladas em órgãos periféricos, bem como seu grau de ativação, apresenta correlação positiva com

a severidade da sepse e, por conseguinte, com o desenvolvimento da disfunção múltipla de órgãos (Russwurm *et al*, 2002).

1.2 Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS são glicolipídeos complexos constituídos de uma porção lipídica denominada lipídeo A, uma região central que possui, em geral, estrutura similar dentro de um gênero ou espécie de bactéria, e cadeias laterais O específicas que são regiões de estrutura bioquímica variável que conferem uma identidade sorológica única às espécies de gram negativas (Golenbock *et al*, 1991; Alexander *et al*, 2001; Bluthé *et al*, 1991).

O LPS livre na circulação sanguínea pode ativar muitos tipos de células, incluindo leucócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos, células endoteliais e plaquetas, levando a alterações que são encontradas nos pacientes com sepse (PERERA, 2001; SABROE *et al*, 2002; ZEUK *et al*, 2002; ANDONEGUI, 2005).

A ativação ocorre através da ligação do LPS a molécula CD14 presente em macrófagos, monócitos, neutrófilos e plaquetas a qual pode ser facilitada pela proteína ligante de LPS (LBP). A glicoproteína CD14, entretanto, não pode iniciar a sinalização intracelular uma vez que está localizada na porção extracelular da membrana e não possui um segmento transmembrana (Amura *et al*, 1998; Ibeagha-Awemu, 2008). A sinalização intracelular se dá através do receptor toll-like 4 (TLR4) que resulta na ativação de inúmeros genes inflamatórios que codificam proteínas como citocinas, quimiocinas, proteínas de adesão e proteínas do sistema complemento (Heuman *et al*, 2002). O LPS, além de liberar mediadores inflamatórios clássicos, induz a geração de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), o que é comumente encontrado nos pacientes sépticos (McCuskey *et al*, 1996).

1.2.1 Lipopolissacarídeo, Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERN) e enzimas antioxidantes.

Entre as EROs podemos citar o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). O O_2^- e $\cdot OH$ são classificados como radicais livres devido à presença de um elétron desemparelhado em sua estrutura

atômica, enquanto as demais espécies coletivamente são classificadas como EROs (Zhang *et al*, 2001).

A produção do O_2^- ocorre mais comumente na mitocôndria. A cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria é a principal fonte de ATP nas células, sendo, portanto, fundamental para a vida. Além disso, é nesta etapa que ocorre o “escape” de elétrons com concomitante formação de O_2^- . (Kovacic *et al*, 2005). Na realidade 1-3% de todos os elétrons da cadeia de transporte de elétrons “escapam” para gerar o ânion superóxido ao invés de contribuir para a redução do oxigênio para a formação de água (Miller *et al*, 2005).

O H_2O_2 pode ser formado pela superóxido desmutase (SOD) e rapidamente degradado pela catalase e glutathione peroxidase (Krötz *et al*, 2002). Ele é mais estável que os outros EROs e é permeável às membranas celulares (Ferreira e Matsubara, 1997; Norberg e Arnér, 2001). Os peroxissomos produzem grande quantidade de H_2O_2 pela ação de oxidases envolvidas no catabolismo de aminoácidos e na oxidação de ácidos graxos (Lehninger *et al*, 2000). Essa organela também contém catalase, que decompõe H_2O_2 , prevenindo o acúmulo deste composto tóxico. Quando há danos nos peroxissomos, o consumo de H_2O_2 se torna prejudicado e sua liberação no citosol contribui significativamente para o estresse oxidativo (Krötz *et al*, 2002; Valko *et al*, 2006).

O radical hidroxila ($\cdot OH$) é altamente reativo e com meia-vida em solução aquosa de 1ns. O $\cdot OH$ pode ser gerado pela mieloperoxidase ou reações catalisadas pelo ferro (Liochev, 2002)

Dentre as RNS podemos citar o óxido nítrico (NO). Este gás bastante lipossolúvel (Wolf, 1997), apesar de menos reativo que o radical $\cdot OH$, pode reagir com o O_2^- formando outra espécie reativa de nitrogênio - o peroxinitrito ($ONOO^-$). O $ONOO^-$ pode se decompor produzindo potentes oxidantes em tampão fisiológico (Zhang *et al*, 2001).

O NO é um radical reativo abundante que age como um importante sinalizador molecular oxidativo em uma diversidade de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso, inibição da atividade plaquetária e regulação imunológica

(Bergenti *et al*, 1999; Marcondes *et al*, 2006). Seus efeitos biológicos são iniciados através da ativação da enzima heterodimérica guanilil ciclase solúvel (GCs) e/ou através de outras reações químicas que independem dessa enzima (Bian e Murad, 2003). A superprodução de espécies reativas de nitrogênio é chamada de estresse nitrosativo, que pode ocorrer também quando o sistema não consegue neutralizar e eliminar a concentração de ERNs produzida (Klatt e Lamas, 2000; Ridnour *et al*, 2004). O estresse nitrosativo é capaz de levar às reações de nitrosilação e nitratação que podem alterar a estrutura das proteínas e inibir sua função normal (Valko *et al*, 2006; Marcondes *et al*, 2001).

A exposição a radicais livres tem levado os organismos vivos a desenvolverem uma série de mecanismos de defesa (Cadenas, 1997) como substâncias e enzimas antioxidantes. As enzimas de defesas antioxidantes incluem a superóxido desmutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx), dentre outras. (Masella *et al*, 2005).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima antioxidante que tem capacidade de dismutar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, A SOD está presente tanto em animais quanto em plantas; nos seres humanos existem três formas de SOD a citosólica que está ligada ao Zinco e cobre (Cu/ Zn-SOD), a mitocondrial que está ligada ao manganês (MnSOD) e a SOD² que é a extracelular (Sandstrom *et al*, 1994). A presença de SOD no organismo é importante para prevenção de danos celulares causados por aumento exagerado de formação de O₂⁻. Atualmente, a SOD tem sido usada para estudos de prevenção de desordens degenerativas como Alzheimer e doença de Parkinson (Halliwell e Whiteman, 2004). As enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) também importantes para proteção do organismo em condições de estresse oxidativo. A GPx catalisa a oxidação da glutathione pelo H₂O₂, enquanto a GR reduz a glutathione oxidada através da oxidação de NADPH (Berk *et al*, 2008).

1.3 Plaquetas

As plaquetas são elementos sanguíneos, cujo diâmetro varia de 2 a 3µm que são produzidas a partir dos megacariócitos na medula óssea (Castro *et al.*, 2006). O

megacariócito é uma célula grande e multinucleada e sua fragmentação pode originar até mil plaquetas (Pontual *et al.*, 2004).

Embora a principal função das plaquetas esteja relacionada à hemostasia. As plaquetas parecem ter importante papel em respostas imunes inatas e adaptativas, participando de processos iniciais e da perpetuação destas respostas e compartilhando muitas propriedades funcionais com os neutrófilos, como a resposta quimiotática e a geração de espécies reativas de oxigênio, podendo estar envolvidas na patofisiologia da sepse e do choque séptico (Elzey *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2006; Albuquerque *et al.*, 2008).

A ativação plaquetária se dá através da ligação de um agonista ao seu receptor específico que, por sua vez, está ligado à proteína G, levando à ativação da fosfolipase C (PLC) e, conseqüentemente, ao aumento de Ca^{+2} intracelular e ativação de uma série de enzimas dependentes deste íon. Esta cascata de sinais intracelulares é responsável pela conversão do receptor $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ do estado de baixa afinidade para o de alta afinidade, permitindo assim a ligação de seu ligante, que é o fibrinogênio, estabilizando o agregado (Abrams *et al.*, 1990, Levy-Toledano, 1999).

A adenosina difosfato (ADP), trombina, TXA_2 e o colágeno são alguns dos agonistas fisiológicos que controlam a ativação plaquetária (Offermanns, 2006; Colman *et al.*, 1986)

1.3.1 Plaquetas e Sepses

Na fase inicial da sepse ocorre diminuição significativa do número de leucócitos e plaquetas no sangue periférico. Alguns trabalhos indicam que a queda do número de plaquetas no sangue é decorrente do acúmulo dessas células em órgãos como pulmão e fígado, o que acaba contribuindo para falência do órgão (Stohlawitz, 1999; Sharron *et al.*, 2012). Existe uma correlação entre o número de plaquetas circulantes e a gravidade da sepse do paciente, ou seja, quanto menor o número de plaquetas circulantes, mais grave é a sepse (Yaguchi *et al.*, 2012).

1.3.2 Plaquetas e Espécies reativas

O primeiro estudo mostrando que as plaquetas liberam EROs foi feito por Marcus *et al* em 1977. Alguns autores sugerem que, assim como os neutrófilos, as EROs derivadas de plaquetas estão envolvidas no mecanismo de defesa e contribuem para a morte de parasitas e bactérias (Cesbron *et al* 1987). Trabalho recente mostrou que plaquetas de animais injetados com LPS apresentam uma maior geração de EROs que o grupo controle (Lopes-Pires *et al*, 2011).

1.4 Antioxidante N-acetilcisteína (NAC)

A NAC é um composto tiólico, isto é, possui um enxofre ligado a um álcool, que vem sendo utilizado na clínica há mais de quarenta anos. Teve seu primeiro uso terapêutico no tratamento de doenças pulmonares congestivas e obstrutivas associadas à hipersecreção de mucosa, como a bronquite crônica e a fibrose cística (Pastor *et al*, 1997). É utilizada como principal tratamento em intoxicações com paracetamol (Harrison *et al*, 1990), caracterizada pela depleção grave de glutathiona hepática (GSH) (Hardman *et al*, 2001). Além disso, é utilizada na presença de rádio contraste para prevenir a nefropatia, e recentemente estudos têm explorado o uso dela em vários distúrbios do sistema nervoso central decorrente do estresse oxidativo (Lavoie *et al*, 2008). Outras aplicações incluem o tratamento da síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) e de casos de imunodeficiência causada pelo HIV-1 (Parcker *et al*, 1997).

A NAC encontra-se disponível como solução oral, intravenosa e preparação inalatória, sua meia vida é de aproximadamente 5,6 horas e 30% é excretado por via renal. Embora os efeitos colaterais sejam geralmente leves, não são raros relatos de cálculo renal durante o tratamento (Sansone e Sansone, 2011).

A NAC funciona como um antioxidante que reduz eficientemente as EROs. Além de sua capacidade de sequestrar diretamente agentes oxidantes, exerce seu efeito antioxidante indiretamente, servindo como precursor para a síntese de glutathiona, que é um antioxidante natural do corpo, protegendo de danos causados pelo oxigênio *in vitro* ou *in vivo* (Pastor *et al*, 1997; Aruoma *et al.*, 1989). A glutathiona, principal antioxidante

do organismo, é sintetizada a partir do L-glutamato e L-cisteína que sofrem ação da enzima gama-glutamilcisteína sintetase levando a formação da L-γ- glutamilcisteína que, por sua vez, é convertida em glutathione na presença de glicina e da glutathione sintetase. A NAC quando desacetilada é convertida em cisteína, etapa limitante na síntese da glutathione (BERK *et al*, 2008; Millea, 2009; Didoné *et al* 2002). A NAC pode se acumular no interior das células já que tem a capacidade de difundir-se pelas membranas das células, uma vez que o grupo acetil da amina da NAC não é polarizado. No interior da célula, a NAC é desacetilada, ficando aprisionada no interior da mesma (Raftos *et al*, 2007).

A glutathione está comercialmente, mas sua biodisponibilidade oral é controversa, sendo então o uso da NAC mais promissor (Lamson e Brignall, 2000).

1.4.1 N-acetilcisteína e sepse

A NAC também é utilizada como ferramenta em estudos de estresse oxidativo e em processos inflamatórios como a sepse. O tratamento de camundongos com NAC diminui a expressão de moléculas de adesão em leucócitos (Birnbaum *et al.*, 2008) e reduz a mortalidade dos animais na sepse experimental (De Mello *et al.*, 2010). Além disso, tem sido demonstrado que a NAC é capaz de inibir diferentes efeitos causados pelo LPS incluindo diminuição da expressão de TLR4 em célula da musculatura lisa vascular (Lin *et al*, 2006), diminuição de danos renais, cardíacos e hepáticos em ratos (Hsu *et al*, 2006), diminuição da febre em coelhos (Huang *et al*, 2006), diminuição da ativação do fator NF-κB e da produção de TNF-α (Shang *et al*, 2006) através da redução da geração de EROS e/ou aumento da produção de glutathione

A influência da NAC na função plaquetária foi pesquisada pelo grupo de Anfossi (2001), que mostra a capacidade dela em potencializar o efeito anti-agregante de nitratos, como a nitroglicerina. Este efeito foi atribuído à melhor bioconversão de nitratos em óxido nítrico, que representa um potente inibidor da função plaquetária através da ativação da guanilato ciclase e aumento dos níveis de 3,5 monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) (Anfossi *et al.*, 2001).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A sepse é um quadro bastante complexo caracterizado por uma resposta inflamatória sistêmica que leva ao estresse oxidativo e, o seu tratamento, ainda, é pouco efetivo, levando a um número grande de óbitos em todo o mundo. Nos últimos anos, evidências mostram que as plaquetas têm um papel importante na sepse, especialmente aumentando sua gravidade e assim, contribuindo para o incremento do índice de mortalidade. Portanto, é importante que trabalhos sejam realizados para melhor elucidação dos mecanismos que modulam esta resposta inflamatória, bem como para avaliar a contribuição de fármacos para um melhor tratamento dos pacientes com sepse.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito temporal do uso da N-acetilcisteína (NAC) na resposta inflamatória e na reatividade plaquetária em modelo animal de sepse, induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Para tanto, os ratos foram tratados com NAC 30 min (início do quadro séptico) ou 6h (sepse já bem caracterizada) após a injeção de LPS.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar marcadores relacionados à inflamação no animal, através da contagem de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e plaquetas no sangue periférico e determinação da concentração plasmática de TNF- α ;
- Avaliar a reatividade plaquetária através de ensaios de agregação e determinação dos níveis intraplaquetários de GMPc;
- Avaliar o estresse oxidativo em plaquetas através da determinação da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da atividade de sistemas antioxidantes (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione oxidase) em plaquetas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando 250-340g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Unicamp). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP, protocolo nº 2338-1.

Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas), onde foram mantidos a 24°C, com iluminação diária de 12 h e com água e alimentação *ad libitum*.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos controle e 3 grupos tratados. No primeiro grupo controle os ratos foram injetados com solução fisiológica (300 µl, i.p.) e no segundo, os ratos foram injetados com N-acetilcisteína (150 mg/kg, i.p.) e, depois de 48h o sangue foi coletado. Nos grupos tratados, o primeiro recebeu uma única injeção de solução de LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (1mg/Kg, i.p.), enquanto que no segundo e terceiro grupos, os ratos foram injetados com N-acetilcisteína 30 min ou 6h após a injeção de LPS. O sangue dos animais dos grupos tratados foi coletado 48h após a injeção de LPS. Em todos os grupos, os animais foram anestesiados com isoflurano e uma incisão longitudinal no abdômen foi feita para a coleta de sangue arterial obtido do ramo descendente da artéria aorta.

4.3 Contagem total e diferencial de leucócitos

Imediatamente após a coleta do sangue arterial, um volume mínimo de sangue (10 µl) foi destinado à contagem total de células em Câmara de Neubauer (diluídos em 190 µl de solução de Turk) e a confecção da lâmina (esfregaço) para posterior contagem diferencial dos leucócitos (Panótipo Rápido).

4.4 Contagem de plaquetas do sangue total

Imediatamente após a coleta do sangue arterial, 10 µl de sangue foram adicionados a 190 µl de oxalato de amônio 1%. Após 10 min, foi realizada a contagem das plaquetas em Câmara de Neubauer.

4.5 Determinação de TNF-α

A concentração plasmática de TNF-α foi determinada utilizando kit de ELISA da BioLegend (San Diego, EUA).

4.6 Obtenção de plaquetas lavadas

O sangue dos ratos controle ou tratados com LPS foi coletado em ACD-C (citrato de sódio 12.4 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM) (9:1 v/v). Primeiramente o PRP foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 *g* em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0.5 mM, citrato trisódico 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12.5 mM, pH 6) na proporção 7:5 (tampão/plasma) foi adicionado ao PRP e centrifugados por 10 min a 800 *g*. O precipitado plaquetário foi ressuspensão em tampão de lavagem e novamente centrifugado a 800 *g* por 10 min. Finalmente, as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de Ca⁺⁺ e o número de plaquetas foi ajustado para 1,2 x 10⁸ plaquetas/ml através de contagem manual utilizando-se câmara de Neubauer. Ao final, foi adicionado cloreto de cálcio à suspensão plaquetária para uma concentração final de 1mM.

4.7 Agregação plaquetária

Em uma cubeta foi colocado 400µl de suspensão plaquetária e a agregação, induzida por ADP (3 µM – 10 µM), foi determinada em agregômetro de 2 canais (Chrono-log Lumi-Aggregometer model 560-Ca, Havertown, PA, EUA). O aparelho foi calibrado para 0% (suspensão de plaquetas lavadas) e 100% (solução de Krebs-Ringer).

4.8 Determinação de GMPc

As plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com inibidor de fosfodiesterase-3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 2mM) por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida, as plaquetas foram ativadas com ADP (10 μ M). A reação foi interrompida 30 min após a adição de ADP por etanol absoluto acidificado gelado em uma concentração final de 67% (v/v) e as amostras foram rigorosamente agitadas por 30s. As amostras foram incubadas no gelo por 30 min e centrifugadas a 4000 *g* por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e separados e os precipitados foram lavados com 0.5 ml de etanol acidificado 67% (v/v) antes da centrifugação de 14000 *g* por 5 min a temperatura ambiente. Os sobrenadantes desta última centrifugação foram coletados e adicionados aos sobrenadantes coletados da centrifugação anterior e foram secos a 55-60°C em banho-maria sob uma corrente de nitrogênio. As amostras foram armazenadas a -20°C até que a determinação do GMPc fosse realizada. O GMPc foi medido utilizando-se o kit da Cayman (Ann Arbor, MI, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Cada amostra foi quantificada em duplicata e os resultados expressos em pmol/ml.

4.9 Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por citometria de fluxo.

A determinação dos níveis de EROs em plaquetas foi realizada como descrito por Swith e Weidemann, 1993. Brevemente, à suspensão de plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi adicionado 5 μ M de 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). Após 10 min, a suspensão plaquetária (500 μ l) foi transferida para os tubos de citometria e incubada com ADP (10 μ M) por 20 min. Em seguida, a suspensão plaquetária foi centrifugada a 800*g* em temperatura ambiente por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet plaquetário ressuspenso em 500 μ l de solução de Krebs-Ringer. Uma amostra contendo somente a suspensão plaquetária, na ausência de DCFH-DA, foi utilizada como controle negativo, enquanto que o controle positivo foi realizado adicionando-se H₂O₂ (8mM) à suspensão. A liberação de EROS foi quantificada usando citômetro de fluxo (FACSCalibur Becton Dickinson, NJ, EUA) equipado com 488nm wavelength argon laser, 525 e 575nm band pass filters. As

plaquetas foram identificadas pelos sinais *forward and side scatter*. Dez mil eventos específicos plaquetários foram analisados pelo citômetro.

4.10 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente e ressuspensas em solução de Krebs-Ringer para uma concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml. As plaquetas foram ativadas com ADP ($10\mu\text{M}$) por 5 minutos. Em seguida, 2 ml da suspensão de plaquetas ativadas foi centrifugada a 2000 *g* por 10 min à 4°C. O pellet plaquetário foi ressuspenso em tampão gelado (HEPES 20 mM, EGTA 1mM, manitol 210 mM, sacarose 70mM, pH 7,2) e sonicado por 10 seg em gelo. A suspensão do lisado plaquetário foi centrifugada a 1500 *g* por 5 min à 4°C e o sobrenadante foi estocado à -80°C até a dosagem. A determinação da atividade da SOD foi feita em duplicata para cada amostra e foi realizada utilizando-se kit comerciais da Cayman (MI, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante.

4.11 Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente e ressuspensas em solução de Krebs-Ringer para uma concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml. As plaquetas foram ativadas com ADP ($10\mu\text{M}$) por 5 minutos. Em seguida, 2 ml da suspensão de plaquetas ativadas foi centrifugada a 2000 *g* por 10 min à 4°C. O pellet plaquetário foi ressuspenso em tampão gelado (Tris-HCl 50mM, EDTA 5mM, DTT 1mM, pH 7,5) e sonicado por 10 seg em gelo. A suspensão do lisado plaquetário foi centrifugada a 10000 *g* por 15 min à 4°C e o sobrenadante foi estocado à -80°C até a dosagem. A determinação da atividade da GPx foi feita em duplicata para cada amostra e foi realizada utilizando-se kit comerciais da Cayman (MI, EUA), conforme especificações do fabricante.

4.12 Determinação da atividade da Glutathione Redutase (GR)

As plaquetas foram isoladas como descrito anteriormente e ressuspensas em solução de Krebs-Ringer para uma concentração final de $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml. As plaquetas foram ativadas com ADP ($10\mu\text{M}$) por 5 minutos. Em seguida, 2 ml da suspensão de plaquetas ativadas foi centrifugada a 2000 *g* por 10 min à 4°C. O pellet plaquetário foi ressuspenso em tampão gelado (KH_2PO_4 50mM, EDTA 1mM, pH 7,5) e sonificado por 10 seg em gelo. A suspensão do lisado plaquetário foi centrifugada a 10000 *g* por 15 min à 4°C e o sobrenadante foi estocado à -80°C até a dosagem. A determinação da atividade da GR foi feita em duplicata para cada amostra e foi realizada utilizando-se kit comercial da Cayman (MI, EUA), conforme especificações do fabricante.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão das médias (EPM) de *n* experimentos. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) sobre o número de leucócitos, neutrófilos e linfócito de ratos tratados com LPS

A figura 1 mostra que o LPS (1 mg/kg, i.p.) aumentou significativamente o número de leucócitos totais do sangue periférico de ratos em relação ao grupo salina. O tratamento dos ratos com NAC (150 mg/kg, i.p.) 30 min ou 6h após a injeção de LPS reduziu o número de leucócitos para valores semelhantes aos observados em ratos injetados com salina. O número de leucócitos totais nos ratos injetados com NAC foi semelhante ao grupo salina (fig. 1).

O LPS aumentou significativamente a porcentagem de neutrófilos no sangue periférico e reduziu a de linfócitos quando comparado ao grupo salina (fig. 2). O tratamento dos ratos com NAC, seja 30 min ou 6h após a injeção de LPS, reverteu o aumento de neutrófilos e a diminuição de linfócitos induzidos pelo LPS. Nos ratos injetados somente com NAC, as porcentagens de neutrófilos e linfócitos permaneceram semelhantes às observadas nos animais injetados com salina (fig. 2).

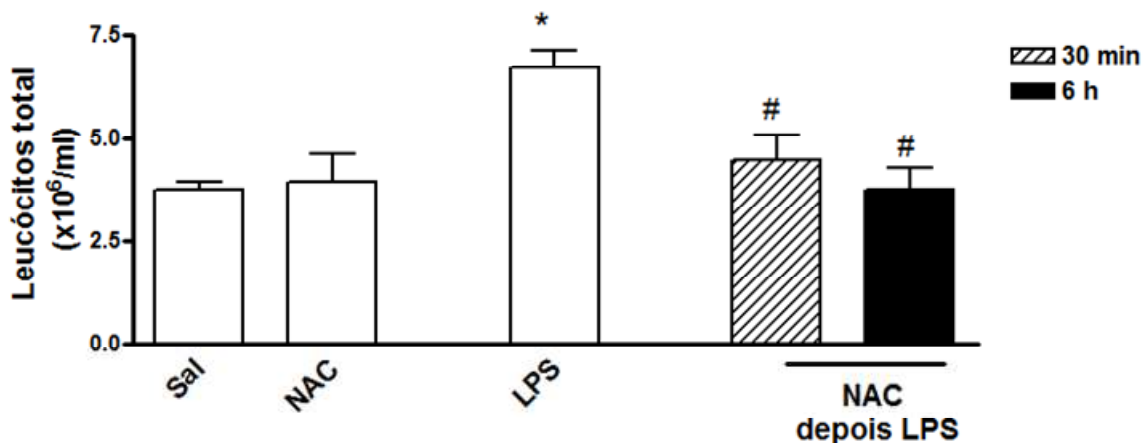


Figura 1: Efeito de NAC sobre o número de leucócitos totais no sangue periférico de ratos injetados com LPS. Os ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg, i.p.) somente, ou com NAC (150mg/kg, i.p.) 30 min ou 6h após a injeção de LPS. Os ratos controle receberam uma única injeção de salina (300 µl, i.p.) ou NAC. O sangue foi coletado 48 h após a injeção de LPS. A contagem de leucócitos totais foi realizada em sangue periférico. *p <0,05 comparado com o grupo salina, # p<0,05 comparado com o grupo LPS. n=4-9.

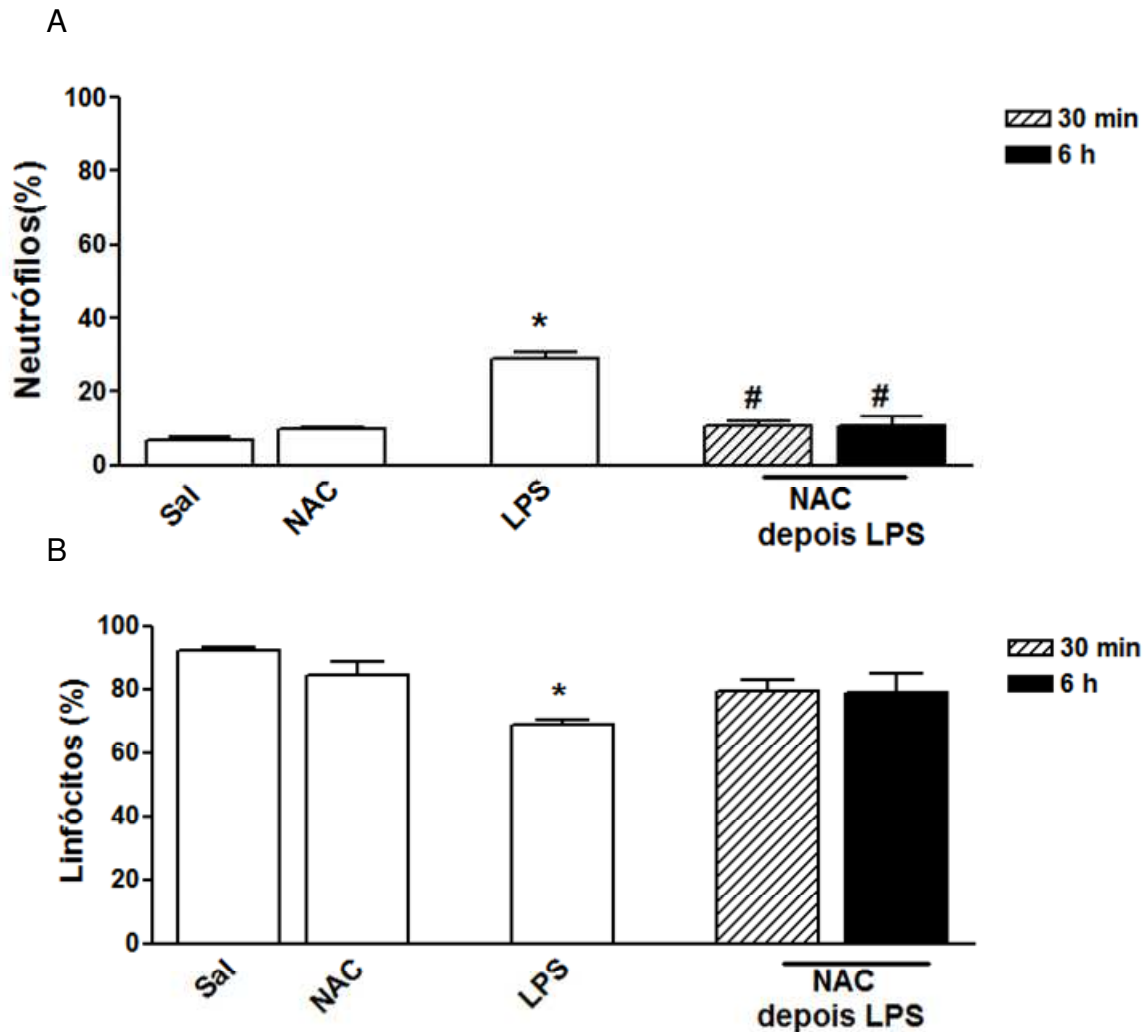


Figura 2: Efeito de NAC sobre a porcentagem de neutrófilos e linfócitos em sangue periférico de ratos injetados com LPS. Os ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg, i.p.) somente, ou com NAC (150mg/kg, i.p.) 30 min ou 6h após a injeção de LPS. Os ratos controle receberam uma única injeção de salina (300 µl, i.p.) ou NAC. O sangue foi coletado 48 h após a injeção de LPS. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada no sangue periférico. As figuras A e B mostram as porcentagens de neutrófilos e linfócitos, respectivamente. *p <0,05 comparado com o grupo salina, # p<0,05 comparado com o grupo LPS. n=4-9.

5.2 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) sobre a concentração de TNF- α no plasma de ratos tratados com LPS

A concentração plasmática de TNF- α em ratos tratados com LPS (1 mg/kg, i.p.) foi, aproximadamente, 40 vezes maior do que a observada em ratos injetados com salina. A injeção de NAC (150 mg/kg, i.p.) 30 min ou 6h após a injeção de LPS reduziu significativamente os níveis plasmáticos de TNF- α , mas estes ainda foram marcadamente maiores que os do grupo salina (5,5 e 4 vezes maior em ratos injetados com NAC 30 min e 6h após a administração de LPS, respectivamente, comparado ao grupo salina) (fig. 3).

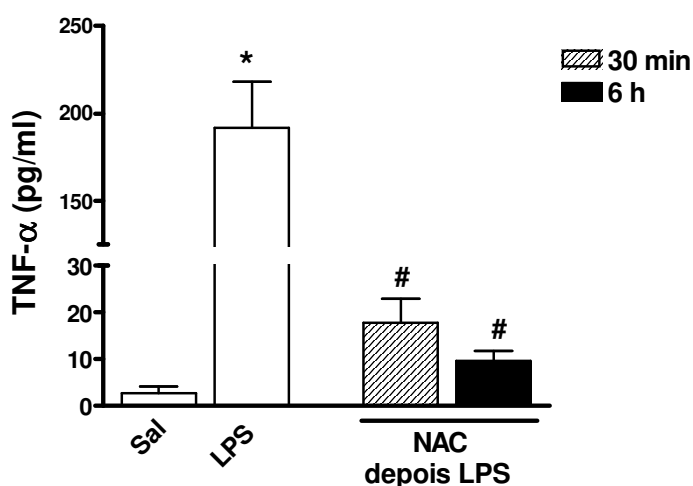


Figura 3: Efeito de NAC sobre a concentração de TNF- α em plasma de ratos injetados com LPS. Os ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg, i.p.) somente, ou com NAC (150mg/kg, i.p.) 30 min ou 6h após a injeção de LPS. Os ratos controle receberam uma única injeção de salina (300 μ l, i.p.). O sangue foi coletado 48 h após a injeção de LPS e a concentração plasmática de TNF- α foi determinada por ensaio de ELISA. *p <0,05 comparado com o grupo salina, # p<0,05 comparado com o grupo LPS. n=4-9.

5.3 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) no número de plaquetas circulantes e na agregação plaquetária

O número de plaquetas circulantes foi significativamente reduzido pela injeção de LPS (1 mg/kg, i.p.) quando comparado ao controle (fig. 4). O tratamento dos ratos com NAC (150 mg/kg, i.p.), 30 min ou 6h após a injeção de LPS, elevou o número de plaquetas para parâmetros normais. Como mostra a figura 4, a NAC sozinha não modificou o número de plaquetas circulantes com relação ao grupo salina.

A estimulação de plaquetas com concentrações crescentes de ADP causou uma significativa agregação plaquetária ($42\pm3\%$, $51\pm3\%$, $54\pm6\%$ de agregação induzida por 3 μ M, 5 μ M e 10 μ M, respectivamente). A agregação plaquetária induzida por ADP de animais tratados com LPS foi significativamente reduzida quando comparada à agregação dos animais tratados com salina (redução de 57%, 58% e 50% da agregação induzida por ADP 3 μ M, 5 μ M e 10 μ M, respectivamente). A agregação plaquetária, induzida por ADP 3 μ M, de ratos injetados com LPS foi marcadamente aumentada por NAC, quer em 30 min ou 6h, mas ainda foi em torno de 20% menor do que a observada no grupo controle injetado somente com NAC. O tratamento dos animais com NAC preveniu a inibição da agregação plaquetária induzida por ADP 5 μ M ou 10 μ M dos ratos injetados com LPS. A NAC não modificou a agregação plaquetária induzida por ADP em qualquer uma das doses utilizadas com relação ao grupo injetado com salina.

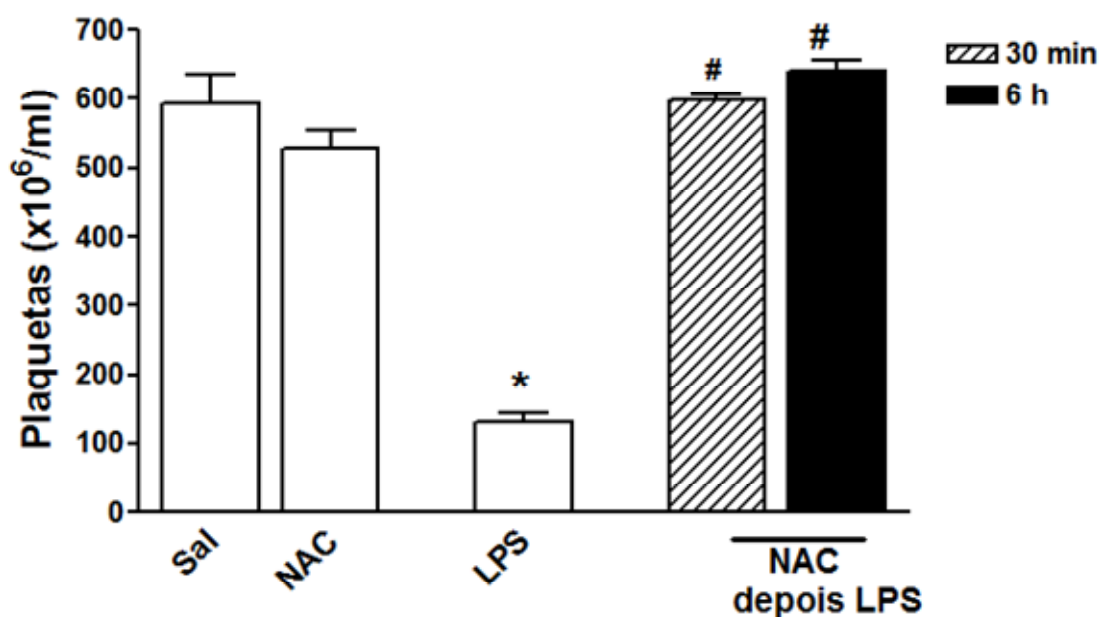


Figura 4: Efeito de NAC sobre o número de plaquetas em sangue periférico de ratos injetados com LPS. Os ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg, i.p.) somente, ou com NAC (150mg/kg, i.p.) 30 min ou 6h após a injeção de LPS. Os ratos controle receberam uma única injeção de salina (300 µl, i.p.) ou NAC. O sangue foi coletado 48 h após a injeção de LPS. A contagem de plaquetas foi realizada no sangue periférico. *p <0,05 comparado com o grupo salina, # p<0,05 comparado com o grupo LPS. n = 4-13

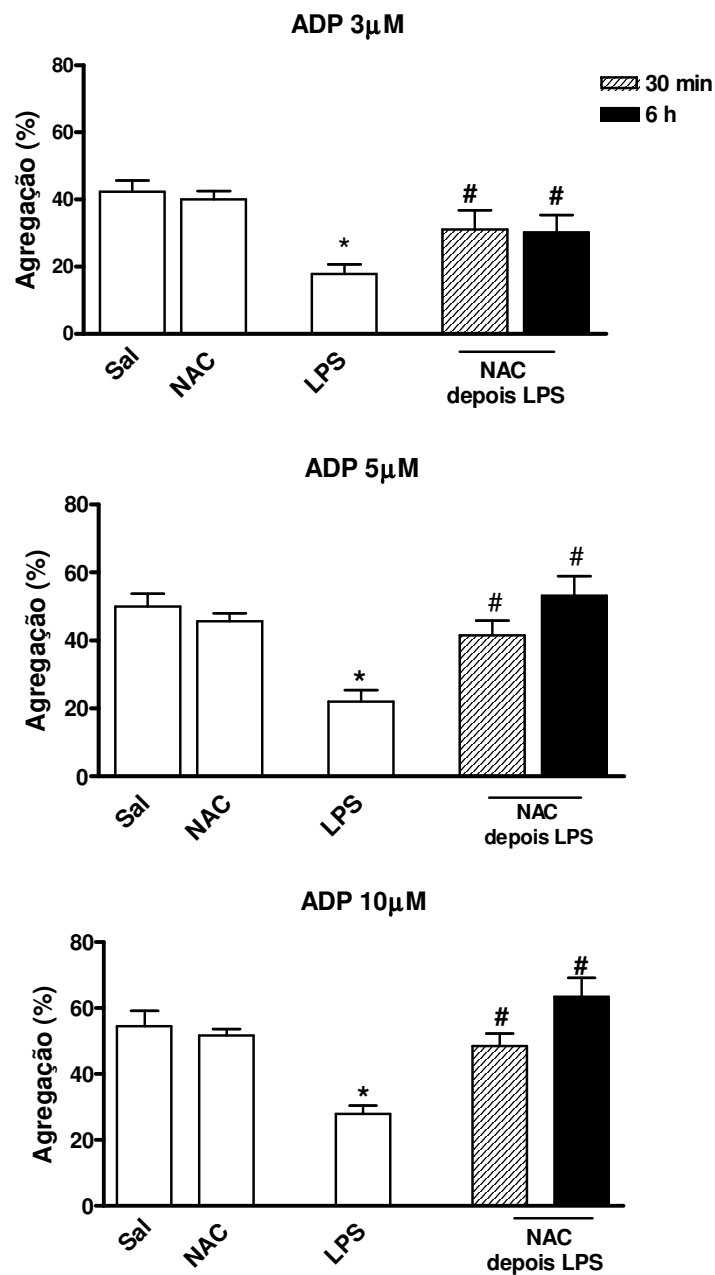


Figura 5: Efeito de NAC na agregação plaquetária de ratos injetados com LPS. Os ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg, i.p.) somente, ou com NAC (150mg/kg, i.p.) 30 min ou 6h após a injeção de LPS. Os ratos controle receberam uma única injeção de salina (300 μl, i.p.) ou NAC. O sangue foi coletado 48 h após a injeção de LPS. A agregação de plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) foi induzida por ADP 3 μM, 5 μM ou 10μM. *p <0,05 comparado com o grupo salina, # p<0,05 comparado com o grupo LPS. n=11-18.

5.4 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) na formação de GMPc em plaquetas de ratos tratados com LPS

O tratamento de ratos com LPS aumentou 2,2 vezes os níveis de GMPc em plaquetas estimuladas com ADP (10 μ M) quando comparado com o grupo injetado com salina (fig. 6). A NAC, quer em 30 min ou 6h após a injeção de LPS, preveniu o aumento dos níveis de GMPc em plaquetas estimuladas com ADP. Em ratos tratados somente com NAC foi observado uma redução marcante, apesar de não ser significativa ($p = 0,14$), dos níveis de GMPc em comparação com plaquetas de ratos injetados com salina (redução de 45%) (fig. 6).

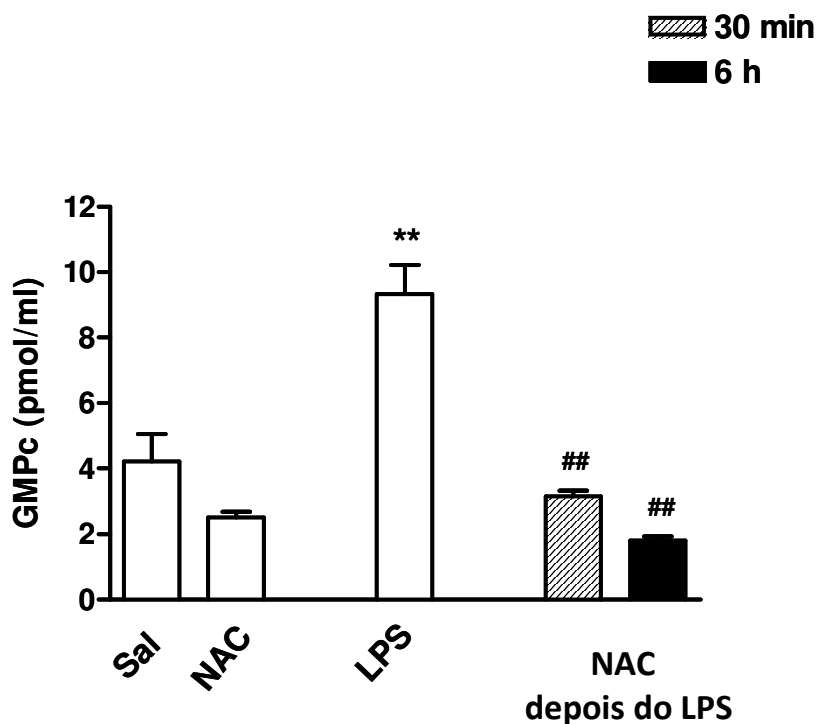


Figura 6: Efeito de NAC nos níveis intraplaquetários de GMPc de ratos injetados com LPS. O sangue dos ratos injetados com salina, LPS (1mg /kg), ou com NAC (150 mg/kg, i.p.), 30 min ou 6h após a injeção de LPS, foi coletado. Os níveis de GMPc foram determinados após 15min de ativação plaquetária (1.2×10^8 plaquetas/ml) com ADP 10 μ M. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo salina, ## $p < 0,01$ comparado com o grupo LPS. n=4-6.

5.5 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plaquetas de ratos tratados com LPS

O tratamento de ratos com LPS (1 mg/kg, i.p.) aumentou 2,6 vezes a produção de EROs em plaquetas quando comparado com o grupo salina (fig. 7). A NAC (150mg/Kg, i.p.) reduziu significativamente a presença intraplaquetária de EROs comparada ao grupo injetado com salina. A quantidade aumentada de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS foi reduzida por NAC, 30 min ou 6h após a injeção de LPS, para níveis semelhantes aos observados nos grupos controle, ou seja, tanto no grupo injetado com salina como no grupo injetado somente com NAC (fig. 7).

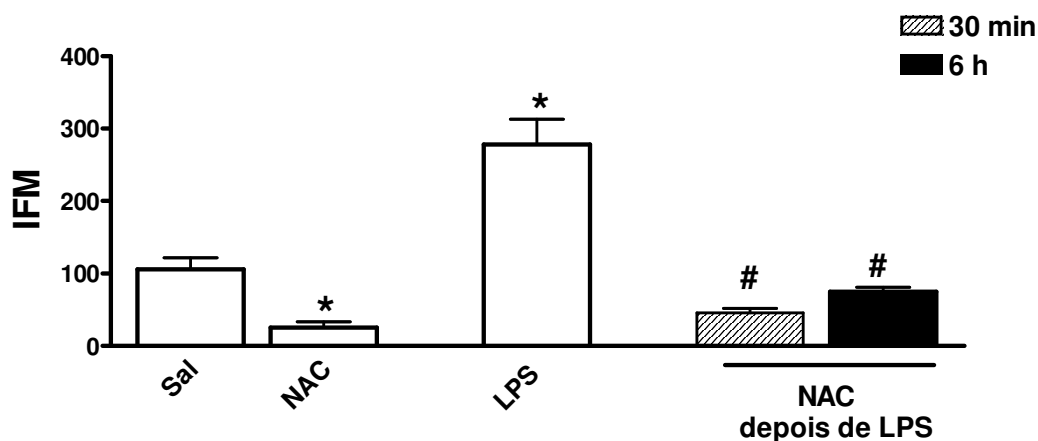


Figura 7: Efeito de NAC na geração de ROS em plaquetas lavadas de ratos injetados com LPS. Os ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg, i.p.) somente, ou com NAC (150mg/kg, i.p.) 30 min ou 6h após a injeção de LPS. Os ratos controle receberam uma única injeção de salina (300 µl, i.p.) ou NAC. O sangue foi coletado 48 h após a injeção de LPS. A produção de EROs foi quantificada por citometria de fluxo utilizando-se DCFH-DA (5µM) em plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) estimuladas com ADP (10µM) *p <0,05 comparado com o grupo salina, # p<0,05 comparado com o grupo LPS. n=4-8. IFM = índice de fluorescência média.

5.6 Efeito da N-acetilcisteína (NAC) na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), glutational peroxidase (GPx) e glutational redutase (GR) em plaquetas de ratos tratados com LPS

A injeção de NAC reduziu 35% a atividade enzimática da SOD em plaquetas ativadas com ADP (10 μ M) com relação ao grupo salina. O LPS aumentou, de maneira não significativa, a atividade da SOD quando comparada com a observada em plaquetas ativadas de ratos injetados com salina (aumento de 31%) (fig. 8). O tratamento dos ratos com NAC, especialmente no grupo 6h, reduziu o aumento da atividade da SOD em plaquetas dos ratos injetados com LPS para níveis semelhantes aos observados no grupo salina. Entretanto, a atividade da SOD em plaquetas do grupo injetado com NAC 30 min ou 6h após a administração de LPS foi ainda 58% e 41%, respectivamente, maior do que a observada no grupo injetado somente com NAC (fig. 8).

A atividade enzimática da GPx e GR foi, significativamente, aumentada nas plaquetas ativadas dos ratos injetados com LPS (a atividade da GPx e GR foi 3,2 e 4,4 vezes maior nas plaquetas dos ratos injetados com LPS comparado ao grupo salina) (fig. 9). A NAC, 30 min ou 6h após a injeção de LPS, preveniu o aumento da atividade da GPx e GR em plaquetas ativadas. A atividade enzimática da GPx e GR em plaquetas do grupo injetado somente com NAC foi semelhante ao grupo salina (fig. 9).

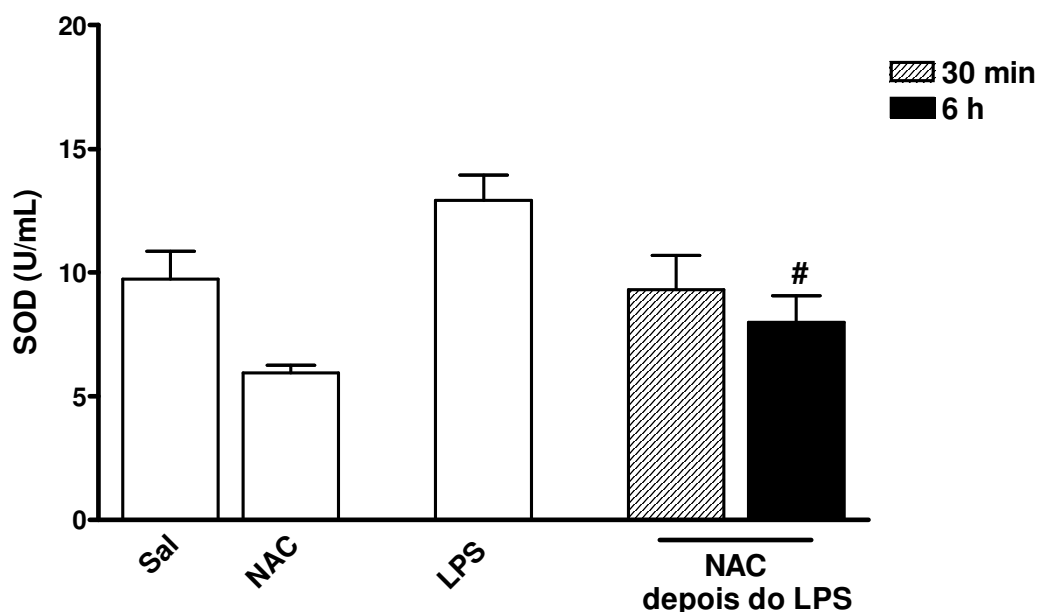


Figura 8: Efeito de NAC na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em plaquetas lavadas de ratos injetados com LPS. Os ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg, i.p.) somente, ou com NAC (150mg/kg, i.p.) 30 min ou 6h após a injeção de LPS. Os ratos controle receberam uma única injeção de salina (300 µl, i.p.) ou NAC. O sangue foi coletado 48 h após a injeção de LPS. A atividade enzimática da SOD foi medida em plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) ativadas por ADP (10 µM) utilizando kit enzimático (Cayman). # $p < 0,05$ comparado com o grupo LPS. $n=6$.

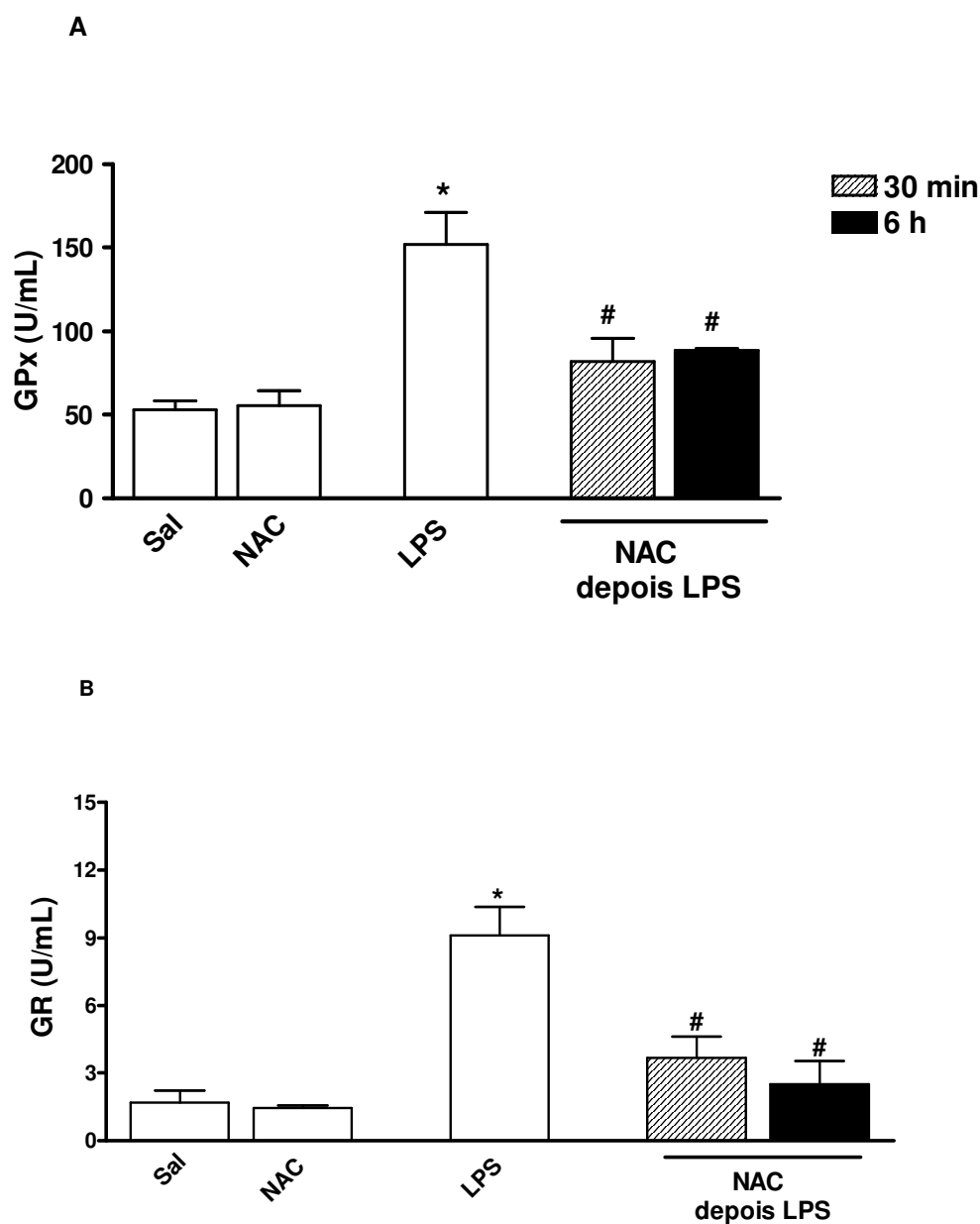


Figura 9: Efeito de NAC na atividade enzimática da glutathiona peroxidase (GPx) e da glutathiona redutase (GR) em plaquetas lavadas de ratos injetados com LPS. Os ratos foram injetados com LPS (1 mg/kg, i.p.) somente, ou com NAC (150mg/kg, i.p.) 30 min ou 6h após a injeção de LPS. Os ratos controle receberam uma única injeção de salina (300 µl, i.p.) ou NAC. O sangue foi coletado 48 h após a injeção de LPS. A atividade enzimática da GPx (painel A) e GR (painel B) foi determinada em plaquetas lavadas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml) estimuladas com ADP (10 µM) através de kit enzimático (Cayman). *p <0,05 comparado com o grupo salina, # p<0,05 comparado com o grupo LPS. n=5-9

6. DISCUSSÃO

A sepse é uma doença grave e de difícil controle, resultado de uma resposta inflamatória sistêmica onde as células do sistema imunológico participam ativamente com intuito de eliminar o agente causador.

Vários estudos mostram que a administração de LPS em animais leva à vários sinais observados na sepse como trombocitopenia, leucopenia na fase precoce e leucocitose na fase mais tardia, febre, aumento de concentração de interleucinas circulantes, aumento da produção de NO e EROS (Brandtzaeg, 1996; Stohlawtz, 1999). Além disso, alguns trabalhos mostram que em paciente com sepse, ou em animais administrados com LPS, ocorre uma diminuição da agregação plaquetária (Saba *et al*, 1984; Sheu *et al*, 1999; Lopes-Pires *et al*, 2011). Em trabalho recente publicado pelo nosso grupo foi mostrado que em ratos, 6h após a administração de LPS, ocorre uma diminuição de 70% do número de leucócitos e de 56% do número de plaquetas circulantes, além de redução da agregação plaquetária induzida por ADP (redução de 33% comparado com o grupo salina) (Lopes-Pires *et al*, 2012).

Dentre as células do sistema imunológico que participam da resposta inflamatória estão os leucócitos que tem a função de reconhecer e fagocitar agentes patógenos (Abbas *et al*, 2005). Entretanto, a ativação intensa e prolongada destas células causa danos em diferentes tecidos. No presente trabalho, mostramos que a injeção de NAC, 30 min após a injeção de LPS, reduz o número de leucócitos para as mesmas contagens observadas nos ratos injetados com salina, indicando que a NAC previne a inflamação nestes animais, como mostrado por outros grupos (Voster *et al*, 2003). Recentemente, foi demonstrado que o aumento da liberação de citocinas de monócitos humanos, como a IL-6, causado por LPS é revertido por NAC (Ngkelo *et al.*, 2012). Neste trabalho os autores concluíram que o LPS aumenta a liberação de EROs via NOX 4, que por sua vez ativam a PI3-K, levando a liberação de IL-6, interleucina envolvida na mobilização de leucócitos na medula óssea (Ngkelo *et al.*, 2012). Além disso, nós demonstramos que a NAC, mesmo 6h após a injeção de LPS, ou seja, quando já é observado um quadro inflamatório nos animais, reduz o número de

leucócitos, indicando que este antioxidante é capaz, não somente de prevenir a resposta inflamatória, mas também de revertê-la. Portanto, podemos especular que NAC, 30 min após a injeção de LPS, não seria tão benéfica, já que estaria reduzindo a capacidade dos animais de retirar o patógeno da circulação. O número de linfócitos e neutrófilos, células responsáveis, respectivamente, pelo reconhecimento e fagocitose do patógeno, nos ratos injetados com LPS também foi normalizado por NAC, confirmando assim a sua contribuição como anti-inflamatório.

No nosso modelo experimental foi observado um aumento significativo da concentração plasmática de TNF- α . O TNF- α é uma importante citocina, levando diferentes efeitos como aumento da produção de EROs (Basuroy *et al.*, 2009), e aumento da expressão do fator de transcrição NF-kB (Newton e Dixit, 2012). O aumento da concentração de TNF- α também está envolvido na apoptose celular, incluindo na apoptose de linfócitos, que pode causar imunossupressão do paciente e, portanto, aumentar a dificuldade do organismo em eliminar o agente invasor (Cerami, 1992; Hotchkiss *et al.*, 2001). A NAC, em 30 min ou 6h, também reduziu a concentração plasmática de TNF- α para níveis normais. Estes resultados, juntamente com os obtidos com aos leucócitos, mostram claramente que a NAC é capaz de prevenir e reverter o quadro inflamatório deste modelo animal de sepse.

Várias evidências têm surgido e, a importância das plaquetas na inflamação, paulatinamente, tem sido estabelecida (Klinger e Jelkmann, 2002). Um dos sinais clássicos da sepse, que é utilizado muitas vezes como indicativo da gravidade do quadro, é a trombocitopenia (Brandtzaeg, 1996). A diminuição de plaquetas circulantes parece estar relacionada com o seqüestro destas células em alguns órgãos como fígado e pulmão (McDougall *et al.*, 1997). Resultados ainda não publicados do nosso grupo mostram que a injeção de animais com LPS não modifica o número de megacariócitos na medula comparado aos ratos injetados com salina. Além disso, o acúmulo de plaquetas em determinados órgãos está relacionado a disfunção ou apoptose desses órgãos (Shibazaki *et al.*, 1999; Sharron *et al.*, 2012). O acúmulo de plaquetas em baço e pulmão de camundongos com sepse leva a apoptose desses tecidos através da liberação da granzima B (Sharron *et al.*, 2012). Outro trabalho mostra que exossomos derivados de plaquetas humanas, pré-incubadas com LPS, causam apoptose de células

endoteliais (Gambim et al., 2007). A NAC, em ambos tipos de tratamento, aumentou significativamente o número de plaquetas circulantes. Portanto, estes resultados indicam que a NAC leva a uma diminuição do acúmulo de plaquetas em diferentes órgãos, contribuindo para a preservação dos mesmos.

A agregação plaquetária foi significativamente inibida pelo tratamento dos animais com LPS, a qual foi acompanhada pelo aumento de GMPc. Está bem estabelecido que o aumento de GMPc leva a inibição da agregação plaquetária, principalmente através da ativação da enzima dependente deste nucleotídeo, a PKG. A ativação da PKG pode inibir a ativação plaquetária por diferentes mecanismos como a fosforilação do receptor de IP3 no sistema tubular denso, levando à diminuição da liberação de Ca^{++} , inibição da entrada de Ca^{++} extracelular, redução da ativação do receptor de fibrinogênio e da polimerização da actina (Horstrup et al., 1994; Cavallini *et al.*, 1996;). Entretanto, resultados ainda não publicados do nosso grupo mostraram que a redução da agregação plaquetária de ratos 48h após o tratamento com LPS independe de GMPc. Portanto, apesar da NAC reduzir os níveis de GMPc e aumentar a agregação plaquetária, provavelmente, estes efeitos ocorrem de maneira independente, isto é, o aumento da agregação não é dependente da diminuição do nucleotídeo. Sendo assim, mais estudos precisam ser realizados para esclarecer como se dá a inibição da agregação de ratos tratados com LPS em 48h e, como a NAC previne este efeito.

Um problema grave na sepse é a coagulação intravascular disseminada, que contribui sobremaneira para a morte do paciente. Este quadro é decorrente, principalmente, da ativação da cascata de coagulação (Jagneaux *et al.*, 2004). Está bem estabelecido que a ativação plaquetária corrobora para a ativação da cascata de coagulação, seja pela liberação de fatores armazenados nos grânulos alfa que participam desta cascata, seja por proporcionarem uma superfície rica em fosfolípidos, fortemente carregados negativamente, que age como catalizadora da ativação dos fatores desta cascata (Morris *et al.*, 2002). Portanto, seria mais simples pensar que o aumento da agregação plaquetária causado pelo tratamento dos animais com NAC não seja benéfica para o paciente com sepse. Entretanto, há trabalhos que mostram que NAC diminui a atividade de fatores da cascata de coagulação, incluindo os fatores II, VII, IX e X (Pizon *et al.*, 2011).

Como já comentado anteriormente a NAC, 30 min ou 6h após a administração de LPS, reduziu o aumento dos níveis intraplaquetários de GMPc causado pelo LPS. No grupo injetado somente com NAC também foi observado uma redução dos níveis de GMPc comparado ao grupo injetado com salina. Os níveis de GMPc podem ser considerados como uma medida indireta da produção de NO na célula. O GMPc é produzido pela ativação da guanilil ciclase pelo NO, portanto, o aumento de GMPc indica um aumento na produção de NO. Já foi descrito que o NO é capaz de reagir com a cisteína e formar nitrosotiois, compostos estáveis que podem liberar, novamente e de maneira lenta, o NO para o meio (Moncada, 1998). Portanto, o NO poderia reagir com o grupamento cisteína da NAC, formando nitrosotiois, o que resultaria em uma redução dos níveis de GMPc em plaquetas dos nossos grupos experimentais.

A sepse é uma condição onde ocorre estresse oxidativo em diversos sistemas (Huet et al., 2008; Huet et al., 2011). O tratamento de ratos com LPS causou um aumento significativo na formação de EROs em plaquetas. Estes resultados estão de acordo com um recente trabalho publicado pelo nosso grupo, mostrando que este aumento de EROs em plaquetas é decorrente, principalmente, da ativação da NADPH oxidase (Lopes-Pires et al., 2012). O tratamento de ratos com NAC, no grupo injetado com salina ou LPS, reduziu significativamente a presença de EROs em plaquetas ativadas. Recentemente, foi demonstrado que a NAC, na verdade, é um pobre sequestrador de O_2^- , H_2O_2 ou peroxinitrito, mas apresenta uma boa eficácia em sequestrar o $\cdot OH$ (Samuni et al., 2013). Um dos principais efeitos da NAC é aumentar a quantidade de glutathiona reduzida das células, mas somente em condições onde estas reservas estão diminuídas (Samuni et al., 2013). Além disso, um trabalho recente mostrou que a NAC inibe a atividade da NADPH oxidase em coração, pulmão, fígado e rins de ratos diabéticos (Lei et al., 2012). Portanto, a redução de EROs em plaquetas por NAC pode ser decorrente da combinação dos três efeitos mencionados acima, mas acreditamos que possa ser especialmente via inibição da NADPH oxidase, já que observamos uma diminuição significativa da produção destas espécies reativas no grupo injetado com salina onde, provavelmente, os níveis de glutathiona reduzida estejam altos.

Apesar do aumento significativo de EROs em plaquetas de ratos tratados com LPS, a atividade da SOD foi apenas aumentada discretamente nas plaquetas desses animais, o que poderia contribuir para o estresse oxidativo nestas células. A atividade da SOD foi, significativamente, diminuída em plaquetas de ratos tratados somente com NAC, as quais também apresentam uma redução da presença de EROs. Estes resultados indicam que a atividade da SOD foi modulada negativamente pela redução da formação de EROs em plaquetas.

Contrariamente ao observado com a SOD, a atividade da GPx e GR foi significativamente aumentada nos ratos injetados com LPS mostrando a eficácia destes sistemas antioxidantes nas plaquetas. A redução da atividade catalítica dessas enzimas por NAC, injetada 30 min ou 6h após o administração de LPS, provavelmente deve-se a redução de EROs nas plaquetas, causada pela redução da atividade da NADPH oxidase ou pelo aumento de glutathiona reduzida. É interessante observar que a NAC sozinha não alterou a atividade da GPx em plaquetas comparada aos ratos injetados com salina, mesmo ocorrendo redução da produção de EROs nestas células. Estes resultados indicam que a atividade da GPx, provavelmente, seja modulada mais pelas reservas de glutathiona reduzida do que pelo aumento de EROs.

7. CONCLUSÃO

A N-acetilcisteína é capaz de reduzir a resposta inflamatória, restabelecer a agregação plaquetária e reduzir o estresse oxidativo de plaquetas tanto no início do quadro séptico como quando este já está bem caracterizado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K; Litchman, A.H; Pilai, S. *Imunologia celular e molecular*. 2005
- Albuquerque, D.P; Oliveira, T. M. F; Filho, A. W. A. M; Mil-Homens, J.A. F; Gusmão, E. S. Aplicação clínico-cirúrgica do plasma rico em plaquetas – estudo Revisional. *Odontologia. Clín.- Científ.* 7(2): 119-122.
- Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and immunity. *J. endotoxin Res.* 2001; 7(3):167-202.
- Amura, C.R; Kamei, T; Ito, N; Soares, M.J; Morrison, D.C. Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins. *J. Immunol.* 1998; 161(5):2552-60.
- Andonegui, G; Kerfoot, S.M; McNagny, K; Ebbert, K. V. J; Pate, K.D; Kubes, P. Platelets Express functional Toll-like receptor-4. *Blood.* 2005; 106(7): 2417-23.
- Andrews, R. K; Munday, A. D; Mitchell, C.A; Berndt, M.C. Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* 2001;98:681-7.
- Anfossi, G; Russo, I; Mattiello, F; Cavalot, F; Trovati, M. N-acetyl-L- cysteine exerts direct anti-aggregating effect on human platelets. *Eur J Clin Invest.* 2001; 31, 452-461.
- Angus, D. C; Linde-Zwirble, W.T; Lidicker, J; Clermont, G; Carcillo, J; Pinsky, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome and associated costs of care. *Critical Care Medicine* 29: 1303-1310, 2001.
- Armaganijan, D. Ativação plaquetária nas formas distintas da doença arterial coronariana. *Arq. Bras. Cardiol.* vol.87 no.4 São Paulo Oct. 2006
- Aruoma, O. I; Halliwell, B. M; Hoey, J. B. the antioxidant action of N- acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid, *Free Radical Biol. Med.* 6, 593.1989.
- Atkuri KR, Mantova JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine – A Safe Antidote for Cysteine/Glutathione Deficiency. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7(4): 355-9.
- Basuroy, S., Bhattacharya, S., Leffler, C.W., Parfenova, H: Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF- α in cerebral vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol . Cell Physiol.*, 2009; 296:C422-C432.
- Bäumer AT; Ten Freyhaus, H; Sauer, H; Wartenberg, M; Kappert, K; Schnabel, P; Konkol, C; Hescheler, J; Vantler, M; Rosenkranz, S. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane recruitment of Rac-1 and p47phox is critical for alpha-platelet-derived growth factor receptor-induced production of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2008; 283(12):7864-76
- Ben-Shaul, V; Lomnitski, L; Nyska, A; Zurovsky, Y; Bergman, M; Grossman, S. The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicol Lett.* 2001;123(1):1-10.
- Bergenti, L; Benes, L; Durackova, Z; Ferencik, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999; 65(18-19): 1865-74
- Bernard GR. N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Med.* 1991;91(3C):54S-59S.
- Berk, M; NG, F; Dean, O; Dodd, S; Bush, A.I. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends Pharmacol Sci.*2008;29:346–351.
- Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. Grune & Stratton. New York, 1984.
- Bhattacharyya, J; Biswas, S; Datta, A. G. Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 2004; 11(3):359-68.
- Bian, K; Murad, F. Nitric oxide (NO): biogeneration, regulation and relevance to human diseases. *Front. Biosci.* 2003; 8:d264-78

Birnbaum, J; Lehmann, C. h; Klotz, E; Hein, O.V; Blume, A; Jubin, F; Polze, N; Luther, D; Spies, C. D. Effects of N-acetylcysteine and tirilazad mesylate on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence, mesenteric plasma extravasation and cytokine levels in experimental endotoxemia in rats. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008; 39(1-4): 99-111.

Bluthé RM, Dantzer R, Kelley KW. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Res.* 1991;573:318-20.

Bone, R.C. Modulators of coagulation. A critical appraisal of their role in sepsis. *Journal of the American Medical Association* 268:3452–3455, 1992.

Bochud, P. Y; Calantra, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Clin. Rev.* 2003; 326(7383):262-66.

Bokock, G. M. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1994; 6(2): 212-18.

Brandtzaeg, P. Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr. Top. microbiol. Immunol.* 1996; 216:15-37.

Brun-Buisson, C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Medicine* 26:S64–S74, 2000.

Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997; 6(4): 391-97.

Canobbio, I.; Balduini, C.; Torti, M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal*, v. 16, n. 12, p. 1329-34, 2004.

Castro, H. C; Ferreira, B. L. A; Nagashima, T; Schueler, A; Rueff, C; Camisasca, D; Moreira, G; Scovino, G; Borges, L; Leal, M; Figueira, A, M; Paschoal, P; Bernardo, V; Bourquinhon, S; Rodrigues, C. R; Santos, D. O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2006; 42 (5).

Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem.* 1996; 271(10):5545-51.

Cerami, A. Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992 Jan;62(1 Pt 2):S3-10.

Chignard, M; Le Couedic, J. P; Vargaftig, B. B; Benveniste, E. J. Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: effect of aggregating agents. *Br. J. Hematol.* 1980; 46(3): 455-64.

Clemetson, K.J; Clemetson, J.M. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost* 1995;21:130-6

Colman. R.W; Figueres, W.R, Searce, L.M, Strimpler, A.M, ZHOU R, Rao A.K. Inhibition of collagen-induced platelet activation by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyl adenosine: Evidence for an ADP requirement and synergistic influence of prostaglandin endoperoxides. *Blood.*1986.

Colman,W; Hirsh, J; Marder, V.J; Salzman, E.W. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 3ed. Philadelphia, Lippincott Company, 1994. p. 489-507.

Comar, S. R; Danchura, S. M; Silva, P. H. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009; 31:6.

Cramer, E.M; Savidge, G.F; Vainchenker, W; Berndt, M. C; Pidard, D; CAEN, J.P; Masse, J.M, Breton-Gorius, J. Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelets and megakaryocytes. *Blood* 1990;75:1220-7

Datasus]. Departamento de Informação e Informática do SUS [on-line] 2012 [Acesso 13dez 2012]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def>.

Dellinger *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.*2013; ;41(2):580-637.

De Benedetto, F; Aceto, A; Dragani, B; Spacone, A; Formisano, S; Pela, R; Donner, C. F; Sanguinetti, C. M. Long-term oral n-acetylcysteine reduces exhaled hydrogen peroxide in stable COPD. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2005. 18: 41–47.

Diodoné, E. C; Cerski, C. T; Kalil, A. N. N-acetilcisteína diminui a congestão hepática na lesão de isquemia e reperfusão - estudo experimental. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2002; 29 (4).

Drake, J; Kanski, J; Varadarajan, S; Tsoras, M; Butterfield, D. A. Elevation of brain glutathione by γ -glutamylcysteine ethyl ester protects against peroxynitrite-induced oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* 2002; 68(6): 776-84.

Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82(1): 47-95.

Flaumenhaft, R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, n.7, p. 1152-60, 2003.

Flohé, L.; Gunzeler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* 1984; v. 105, p. 114-121.

Freedman, J. E. Oxidative Stress and Platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2008; 28(3): s11-s16.

Friedman, G; Silva, E; Vincent, J. L. Has the mortality of septic shock changed with time? *Critical Care Medicine* 26:2078–2086, 1998.

Furie, B. C.; Flaumenhaft, R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granulate secretion, signaling and cell adhesion. *Thromb Haemost*, v. 86, n. 1, p. 214-21, 2001.

Gambim M, Carmo A, Marti L, Verissimo-Filho S, Lopes L, et al. (2007) Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit Care Med* 11: R107.

Gawaz, M; Dickfeld, T., Bogner, C., Fateh-Moghadam, S. & Neumann, F.J. (1997). Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 23: 379-385.

Gianni, D; Bohl, B; Courtneidge, S. A. and Bokoch G.M. The Involvement of the Tyrosine Kinase c-Src in the Regulation of Reactive Oxygen Species Generation Mediated by NADPH Oxidase-1. *Mol Biol Cell.* 2008; 19(7): 2984–2994

Gibbins, J. M. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. *J Cells Sci*, v. 117, p. 3415-25, 2004.

Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K, Raetz CR. Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J. Biol. chem.* 1991; 266(29):19490-98.

Gu, M; Xi, X; Englund, G.D; Berndt, M.C; Du, X. Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin α (IIb) β (3) using a reconstituted mammalian cell expression model. *J Cell Biol* 1999;147:1085-96.

Hamberg, M; Svensson, J; Samuelsson, B. Tromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975; 72(8): 2994-98.

Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Gilman, A.G. Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 10 ed. International edition. McGraw Hill, 2001.

Harrison, P. M; Keys, R; Bray, G. P; Alexander, G. J; Williams, R. Improved outcome of paracetamol-induced fulminant hepatic failure by late administration of acetylcysteine. 1990. *Lancet*.335: 1572–1573.

Hartwig, JH. Platelet structure. In: Michelson, A. D. Platelets. California: Academic Press, 2002.

Heemskerk, J. W. et al. Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment. *Trends Cardiovasc Med*, v. 15, n. 3, p. 86-92, 2005.

Heuman, D; Roger, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta.* 2002; 323(1-2): 59-72.

Holmsen, H; Weiss, HJ. Secretable pools in platelets. *Annu. Rev. Med.* 1979; 30:119-30.

Horstrup,K; Jablonka,B; Honig-Liedl, P; Just, M; Kochsiek,K; Walter, H. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur. J. Biochem.*1994; 225. 21 -27.

Hotchkiss, R. S; Tinsley, K.W; Swanson PE, Schmieg RE Jr, Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 2001 Jun 1;166(11):6952-63.

Hotchkiss, R.S; Karl, I. K. The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine* 348:138–150, 2003.

Hsu, B.G; Lee, R.P; Yang, F.L; Harn, H.J; Chen, H.I. Post-treatment with M-acetylcysteine Ameliorates Endotoxin Shock-Induced organ Damage in Conscious Rats. 2006; 79: 2010-6

Huang, C. S; ANDERSON, M. E; MEISTER, A. Amino acid sequence and function of the light subunit of rate kidney gamma- glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 20578-20583.

Huang, W.T; Lin, M.T; Chang, C.P. Na NMDA Receptor-dependent Hydroxyl Radical Pathway in the Rabbit Hypothalamus May Mediate Lipopolysaccharide Fever. *Neuropharmacology.* 2006; 50: 504-11

Ibeagha-Awemu, E. M; Lee, J; Ibeagha, A.E; Zhao X. Bovine CD14 characterization and relationship between polymorphisms and surface expression on monocytes and polymorphonuclear neutrophils. *BMC Genetics.* 2008; 9: 50.

Huet O, Cherreau C, Nicco C, Dupic L, Conti M, Borderie D, Pene F, Vicaut E, Benhamou D, Mira JP, Duranteau J, Batteux F. Pivotal role of glutathione depletion in plasma-induced endothelial oxidative stress during sepsis. *Crit Care Med.* 2008 Aug;36(8):2328-34.

Huet O, Dupic L, Harrois A, Duranteau J. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011 Jan 1;16:1986-95. Review.

IMGENEX. Imgenex Corp. [on-line] [Acesso em 24 abr 2013]. Disponível em: <http://www.imgenex.com/Toll-likeReceptors.php>.

Jayachandran, M; Brunn, J.G; Karnicki, K; Miller, R.S; Owen, W.G; Miller, V.M. In vivo of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. *J. Appl. Physiol.* 2007; 102(1): 429.

Jagneaux T, Taylor DE, Kantrow SP. Coagulation in sepsis. *Am J Med Sci.* 2004;328(4):196-204

Jean-Baptiste, E. Cellular Mechanisms in Sepsis. *Journal Intensive Care Medicine.* 2007; 22(2): 63-72.

Gibson, K. R; Nelson, I. I; Barrett, F; Winterburn, T. J; Sharma, S; Macrury, S. M; Megson, I. I. evaluation of the antioxidant properties of N-acetylcysteine in human platelets: Prerequisite for bioconversion to glutathione for antioxidant and antiplatelet activity. *J Cardivasc Pharmacol.* 2009; 54: 319- 326.

Khadour, F. H; Panas, D; Ferdinandy, P; Schulze, C; Csont, T; Lalu, M. M; Wildhirt, S. M; Schulz, R. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(3):H1108-15.

Keen, R. R; Stella, L; Flanagan, D. P; Lands, W. E. Differential detection of plasma hydroperoxides in sepsis. *Crit. Care Med.* 1991; 19(9):1114-19.

Kitaoka N, Liu G, Masuoka N, Yamashita K, Manabe M, Kodama H. Effect of sulfur amino acids on stimulus-induced superoxide generation and translocation of p47phox and p67phox to cell membrane in human neutrophils and the scavenging of free radical. *Clin Chim Acta.* 2005;353(1-2):109-16

Klatt, P; Lamas, S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.* 2000; 267(16):4928-44.

Krause, K. H. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol.* 2007; 42 (4): 256-62.

Klinger, M.H.F; Jelkmann, W. Role of Blood Platelets in Infection and Inflammation *Jour of inter.* 22:913–922 (2002)

Kloczewiak, M; Timmons, S; Hawiger, J. Recognition site for the platelet receptor is present on the 15-residue carboxy-terminal fragment of the gamma chain of human fibrinogen and is not involved in the fibrin polymerization reaction. *Thromb Res* 1983;29:249-55

Kroll, M. H; Hellums, J. D; McIntire, L. V; Schfer, A. I; Moake, J. L. Platelets and shear stress. *Blood* 1996;88:1525-41.

Krötz, F; Sohn, H. Y; Gloe, T; Zahler, S; Riexinger, T; Schiele, T. M; Becker, B. F; Theisen, K; Klauss, V; Pohl, U. NAD(P)H-oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* 2002; 100(3): 917-24.

Kovacic, P; Pozzos, R. S; Somanathan, R; Shangari, N; O'Brien, P.J. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12(22): 2601-23.

Lamson DW, Brignall MS. The use of nebulized glutathione in the treatment of emphysema: a casereport. *Altern Med Rev.*2000;5:429–431.

Landi, E. P; Marques, J. F. C. J. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2003. 25 (1).

Lavoie S, Murray MM, Deppen P, et al. Glutathione precursor, N-acetyl- cysteine, improves mismatch negativity in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacol.* 2008;33:2187–2199.

Lei S, Liu Y, Liu H, Yu H, Wang H, Xia Z. Effects of N-acetylcysteine on nicotinamide dinucleotide phosphate oxidase activation and antioxidant status in heart, lung, liver and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Med J.* 2012 Mar;53(2):294-303. doi: 10.3349/ymj.2012.53.2.294.

Lin, F.Y; Chen, Y.H; Tasi, J.S; Chen, J.W; Yang, T.L; Wang, H.J; Li, C.Y; Chen, Y.L; Lin, S.J. Endotoxin induces toll-like receptor 4 expression in vascular smooth muscle cells via NADPH oxidase activation and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Atheroscler. Thromb. Vasc Biol.* 2006; 26: 2630-2637.

Mcdougall EM, Bennett HF, Monk TG, et al. Functional MR imaging of the porcine kidney, physiologic changes of prolonged pneumoperitoneum. *JSLs.* 1997;1(1):29-35.

Mavrommatis, A. C; Theodoridis, T; Orfanidou, A et al. Coagulation System and Platelets are Fully Activated in Uncomplicated Sepsis. *Crit Care Med.* 2000; 28:451-457.

Marcondes, S; Turko, I.V; Murad, F. Nitration of succinyl-CoA:3-oxoacid CoAtransferase in rats after endotoxin administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001; 98(13):7146-51.

Marcondes, S; Cardoso, M. H; Morganti, R.P; Thomazzi, S. M; Lilla, S; Murad, F; De Nucci, G; Antunes, E. Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for alpha-actinin nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(9):3434-9.

Martin, G. S; Mannino, D. M; Eaton, S; Moss, M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546-1554.

Martinez-Losa M, Cortijo J, Juan G, O'Connor JE, Sanz MJ, Santagelo F, Morcillo EJ. Inhibitory Effects of N-acetylcysteine on the Functional Responses of Human Eosinophils in Vitro. *Clin Exp Allergy.* 2007; 37:714-22

Masella, R; Di Benedetto, R; Vari, R; Filesi, C; Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005;16(10):577-86.

McCuskey R, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovascular research.* 1996; 32(4): 752-63.

Millea, P.J. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician*. 2009;80:265–269.

Miller, E. R; Pastor-Barriuso, R; Dalal, D; Riemersma, R. A; Appel, L. J; Guallar, E. Metaanalysis: High-dosage Vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann. Intern. Med*. 2005; 142(1): 37-46.

Morris, P.E; Hite, R. D; Ohl, C. Relationship Between the Inflammation and Coagulation Pathways in Patients with Severe Sepsis: Implications for Therapy with Activated Protein C. *Biodrugs* 2002;16(6):403-17.

Moncada, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med* 1999;92:164-169

Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Mar 1;4(3). pii: a006049. doi: 10.1101/cshperspect.a006049.

Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, Adcock I, Kirkham PA. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G α dependent PI-3kinase signalling. *J Inflamm (Lond)*. 2012 Jan 12;9(1):1.

Nogueira, C. W; Zeni, G; Rocha, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Che. Rev*. 2004; 104(12): 6255-85. O'Brien, J.M. J.R; Ali, N.A; Aberegg, S.K. Sepsis. *Am J Med* 120:1012-22, 2007.

Offermans, S. Activation of platelets function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res*. 2006; 99(12): 1293-1304.

Packer, L.; Cadenas, E. *Handbook of Synthetic Antioxidants*. New York, 1997; Marcel Dekker, Inc. (24-28).

Painter, R. G.; Ginsberg, M. H. Centripetal myosin redistribution in thrombin-stimulated platelets: relationship to platelet factor 4 secretion. *Exp Cell Res*, v. 155, n. 1, p. 198-12, 1984.

Perera, P.Y; Mayadas, T.N; Takeuchi, O; Akira, S; Zaks- Zilberman, M; Goyert, S.M; Vogel, S.N. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J. Immunol*. 2001; 166(1):574-81.

Pizon, A. F; Jang, D.H; Wang, H. E. The in vitro effect of N-acetylcysteine on prothrombin time in plasma samples from healthy subjects. *Acad Emerg Med*. 2011 Apr;18(4):351-4.

Pontual, M.A.B., Magini, R.S. 2004. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento-das pesquisas científicas à clínica odontológica. Editora Santos, São Paulo.

Pastor, A.; Collado, P.S.; Almar, M.; Gonzáles-Gallego, J. Microsomal function in biliary obstructed rats: effects of S-adenosyl-methionine. *Journal of Hepatology*,24:353-359.1996.

Raftos, J.E; Whillier, S; Chapman, B. E. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 2007; 39: 1698-1706.

Rahman, I. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutat Res*. 2005; 579: 58-80.

Reed, G. L. Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost*, 30(4):441-50, 2004.

Ridnour, L. A; Thomas, D. D; Mancardi, D; Espey, M.G; Miranda, K. M; Paolocci, N; Feelisch, M; Fukuto, J; Wink, D. A. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species putting perspective on stressful biological situations. *Biol. Chem*. 2004; 385(1):1-10.

Ruoslahti, E; Pierschbacher, M. D. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell* 1986;44:517-8.

Russwurm, S., Vickers, J., Meier-Hellmann, A., Spangenberg, P., Bredle, D., Reinhart, K., Losche, W. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*. 2002; 17:263-268.

Saba HI, Saba SR, Morelli G, Hartmann RG. Endotoxin-mediated inhibition of human platelet aggregation. *Thromb. Res*. 1984; 34:19-33

Sabroe, I; Jones, E. C; Usher, L. R; Whyte, M. K; Dower, S.K. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J. Immunol.* 2002; 168(9):4701-10.

Sales Júnior, J.A, David, C. M; Hatum, R, Souza, P.C.S.P; Japiassú, A, Pinheiro, C. T. S; Friedman, G; Silva, O. B; Dias, M. A; Koterba, E; Dias, F. S; Piras C; Raggio R. L. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Rev Bras Terapia Intensiva.* 2006; 18(1).

Salvemini, D; Riley, D. P; Lennon, P. J; Wang, Z. Q; Currie, M. G, Macarthur, H; Misko, T. P. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br. J Pharmacol.* 1999; 127(3):685-92.

Sansone, R.A; Sansone, L. A. GETTING A KNACK FOR NAC: N-Acetyl-Cysteine. *Innov Clin Neurosci.* 2011; 8 (1): 10-14.

Sharron M, Hoptay CE, Wiles AA, Garvin LM, Geha M, Benton AS, Nagaraju K, Freishtat RJ. Platelets induce apoptosis during sepsis in a contact-dependent manner that is inhibited by GPIIb/IIIa blockade. *PLoS One.* 2012;7(7):e41549. doi: 10.1371

Schafer, F. Q; Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(11):1191-212.

Shang, F; Zhao, L; Zheng, Q; Wang, J; Xu, Z; Liang, W; Liu, H; Liu, S; Zhang, L. Simvastatin inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α expression in neonatal rat cardiomyocytes: The role of reactive oxygen species. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 2006; 351(4):947-52.

Shangang F, Zhao L, Zheng Q, Wang J, Xu Z, Liang W, Liu S, Zhang L. Simvastatin Inhibits Lipopolysaccharide-induced Tumor Necrosis Factor- α Expression in Neonatal Rat Cardiomyocytes: The Role of Reactive Oxygen Species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351: 947-52

Sharron, M; Hoptay, C. E; Wiles, A. A.; Garvin, L. M.; Geha, M; Benton, A.S; Nagaraju, K; Freishtat, R. J. Platelets Induce Apoptosis during Sepsis in a Contact-Dependent Manner That Is Inhibited by GPIIb/IIIa Blockade. *PLoS One.* 2012; 7(7):e41549

Sheu JR, Hung WC, Su CH, Lin CH, Lee LW, Lee YM, Yen MH. The antiplatelet activity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide is mediated through a nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur. J. Haematol.* 1999; 62:317-326.

Shibazaki M, Kawabata Y, Yokochi T, Nishida A, Takada H, Endo Y. Complement-dependent accumulation and degradation of platelets in the lung and liver induced by injection of lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 1999 Oct;67(10):5186-91.

Somers, M. J; Burchfield, J. S; Harison, D. G. Evidence for a NADH/NADPH oxidase in human umbilical vein endothelial cells using electron spin resonance. *Antioxid Redox Signal.* 2000; 2(4): 779-87.

Stohlawtz P, Folman CC, von dem Borne AE, Pernerstorfer T, Eichlerm HG, Panzer S, Jilma B. Effects of Endotoxemia on Thrombopoiesis in Men. *Thromb Haemost.* 1999; 81:613-7.

Torti, M. et al. Rap1B and Rap2B translocation to the cytoskeleton by von Willebrand factor involves Fc gamma II receptor-mediated protein tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, v. 274, n. 19, p. 13690-97, 1999.

Takala, A; Nupponen, I; Kylanpaa-Back, M. L; REPO, H. Markers of inflammation in sepsis. *Annals Medicine* 34:614–623, 2002.

Thomas, J. A; Mallis, R. J. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Exp Gerontol.* 2001;36(9):1519-26.

Tran, D. D; Groeneveld, A. B; Van der Meulen, J; Nauta, J. J; Strack, R. J; Van Schijndel; Thijs, L. G. Age, chronic disease, sepsis, organ system failure, and mortality in a medical intensive care unit. *Critical Care Medicine* 18:474–479, 1990. Valko, M; Leibfritz, D; Moncol, J; Cronin,

M.T; Mazur, M; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 39(1): 44-84.

Vandijck, D; Decruyenaere, J.M; Blot, S. I. The value of sepsis definitions in daily ICU-practice. *Acta Clinica Belgica* 5:220-6, 2006.

Van Zanten, G.H; Heinen, H.F.G; Wu, Y; Shut-Hese, K.M; Slootweg, P.J; IN: Groot, P.G et al. A fifty percent reduction of platelet surface glycoprotein Ib does not affect platelet adhesion under flow conditions. *Blood* 1998;91:2.353-59.

Victor, V. M, Rocha, M; De la Fuente M. N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free radic. Res.* 2003;37(9):919-29.

Vosters, O., Neve, J., DeWit, D., Willems, F., Goldman, M. and Verhasselt, V., Dendritic cells exposed to nacystelyn are refractory to maturation and promote the emergence of alloreactive regulatory t cells. *Transplantation* 2003. 75: 383–389.

Wencel, J. D. D; Plow, E.F; Kunicki, T.J; Woods V.L; Keller; D.M; Ginsberg; M. H. Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 1986;124:324-34.

Wu, F; Schuster, D. P; Tyml, K; Wilson, J. X. Ascorbate inhibits NADPH oxidase subunit p47phox expression in microvascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(1):124-31.

Yaguchi, A; Lobo, F. L. M; Vicent, J. L; Pradier, O. Platelet function in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2: 2096–2102

Zhang, H; Joseph, J; Feix, J; Hogg, N; Kalyanaraman, B. Nitration and oxidation of a hydrophobic tyrosine probe by peroxynitrite in membranes: comparison with nitration and oxidation of tyrosine by peroxynitrite in aqueous solution. *Biochemistry.* 2001; 40(25):7675-86.

Zeuke, S; Ulmer, A. J; Kusumoto, S; Katus, H.A; Heine, H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc. Res.* 2002; 56(1):126-34.