

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**PRISCILLA OLIVIERI BENCK DE JESUS**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE PROCALCITONINA E ÓXIDO NÍTRICO  
NA SEPSE E SUA RELAÇÃO COM A PRESSÃO ARTERIAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE PUNÇÃO CECAL EM RATOS WISTAR**

**Campos dos Goytacazes**

**2014**

**PRISCILLA OLIVIERI BENCK DE JESUS**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE PROCALCITONINA E ÓXIDO NÍTRICO  
NA SEPSE E SUA RELAÇÃO COM A PRESSÃO ARTERIAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE PUNÇÃO CECAL EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal.

**ORIENTADOR: Professora Fernanda Antunes**

**Campos dos Goytacazes**

**2014**

PRISCILLA OLIVIERI BENCK DE JESUS

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE PROCALCITONINA E ÓXIDO NÍTRICO  
NA SEPSE E SUA RELAÇÃO COM A PRESSÃO ARTERIAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE PUNÇÃO CECAL EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal.

Aprovada em 18/09/2014

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lukiya Silva Campos Favarato - UFV

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Barbara Freitas Rodrigues - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Paula Alessandra Di Filippo - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Antunes (Orientador) - UENF

## AGRADECIMENTOS

Devo primeiramente agradecer a Deus por ter me abençoado com a presença de pessoas tão importantes na minha vida profissional que acabaram fazendo parte da minha vida pessoal. Agradecer a Ele por ter me proporcionado crescer em uma família que me apoia e me estrutura na minha caminhada.

E então posso agradecer a cada um por ter se permitido estar ao meu lado nessa etapa que se finaliza.

A minha mãe, Gleice Olivieri, que sempre torceu por mim e me apoiou sem medir esforços para me tornar a pessoa que sou hoje. Que me ama mais que qualquer pessoa desse mundo e vibra com a minha felicidade. Basta isso para ela. Agradeço por todo esse amor que recebi.

A minha orientadora e amiga, Fernanda Antunes, que me ensinou muito mais do que anestesiologia e farmacologia. Ela me ensinou que amigos são para todos os momentos, que rir é sempre o melhor remédio (e descobri que é mesmo), que os problemas não são para a vida toda. Enfim me ensinou a aproveitar o que nos faz feliz e deixar de lado tudo que nos entristece. Uma pessoa com uma gargalhada dessa não podia ser diferente.

Ao meu parceiro para todos os momentos, Pedro Henrique Monteiro que me apoia em tudo. Pela confiança, carinho e paciência comigo. Agradeço todos os dias por ter uma pessoa tão especial participando de momentos tão importantes comigo.

A minha amiga Alexandra do Amaral, que além de ser minha dupla dinâmica em trabalhos, aulas, pesquisa e rotina do hospital, é a pessoa com os melhores conselhos do mundo. A pessoa mais engraçada do planeta que me faz rir a qualquer momento do dia, nem que seja por uma mensagem de texto. Uma amiga para todas as horas, minha “gêmea” e que quero sempre ao meu lado.

Ao meu amigo Guilherme Monteiro, meu “roommate” de plantão. Que veio morar comigo para me ajudar no momento em que eu mais precisei. Um profissional maravilhoso e de um coração de gelo fácil, fácil de derreter. Não é tão durão quanto aparenta; ele também sabe ser doce. Nossa amizade começou de maneira sutil, mas tão natural que, quando percebi, ele já fazia parte da minha vida.

Ao amigo Guilherme Vieira (Sorriso para os íntimos) que, com seu alto astral, contagia todos a sua volta. Dono de um coração gigante que ajuda a todos com um belo sorriso que justifica o apelido.

Aos amigos André Gimenes e Amanda Rocha pelo aprendizado que me proporcionaram desde a época da graduação e pelo cuidado e carinho que têm comigo. Aos amigos Melissa Petrucci e Luiz Eckhardt que se tornaram ainda mais especiais durante esse período, preocupando-se com meu bem-estar e me mantendo sempre sorrindo no momento em que mais precisei dos amigos por perto.

Aos amigos da anestesia Anderson Nunes, Flávio Soffiati, Gabriel Barbosa, Kenas Aguiar, Ana Carolina Beliene, Leonardo Waldstein, Laiza Mascarenhas e Loise Lopes pela convivência agradável e troca de conhecimentos.

Aos amigos da cirurgia Fabiane Azeredo, Oscar Tirado, Antônio Felipe da Fonseca (Felipão), Jussara Peters, Renato Moran, Matheus Mota, Tomas Ottoni, Daniela Fantini, Silvia Ruiz, Thaisa Aguirre, Saulo Quina e Lorrana Abud pela convivência e risadas garantidas.

Aos amigos Josias Machado e Elisabete Sales por estarem disponíveis a ajudar no experimento nas etapas executadas no laboratório de Patologia Clínica e no laboratório de Biologia Molecular.

Aos membros da banca Lukiya Favarato, Ana Bárbara Rodrigues e Paula Di Filippo pela disponibilidade de estarem presentes neste dia.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi reproduzir o modelo experimental de sepse no rato e verificar se a pressão arterial pode ser um indicador confiável do início do processo da sepse, comparando este dado com a quantificação de procalcitonina e óxido nítrico. Foram utilizados 20 animais anestesiados com anestesia volátil com halotano. O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira tinha como objetivo estipular o tempo de avaliação necessário para observar os primeiros sinais de sepse. Para isso, foi avaliado a frequência cardíaca, frequência respiratória e leucometria de 9 animais, em três momentos: M1, imediatamente após a manipulação; M2, 2 horas após a manipulação e M3, 4 horas após a manipulação. Nesta etapa, observou-se leucocitose com 2 horas e queda dos leucócitos com 4 horas. A partir desse resultado, estipulou-se que a avaliação da pressão arterial, leucometria e biomarcadores seriam realizadas nos três momentos citados acima para a segunda etapa.

Para mensuração da pressão arterial, foi realizada dissecação da artéria carótida e o cateter inserido foi fixado atrás da orelha para as avaliações nos momentos estipulados. Nesta etapa, foram utilizados 11 animais, sendo 5 SHAM e 6 induzidos ao modelo experimental de sepse. Para indução da sepse, foi realizada uma incisão na linha média a fim de alcançar o ceco que foi exposto e teve seu ápice ligado de forma "frouxa" com fio de nylon 0 e perfurado três vezes com auxílio de uma agulha hipodérmica 40x16. O ceco foi devolvido à cavidade e aos planos anatômicos suturados com fio de nylon 3-0 com pontos simples separados. Os animais do grupo SHAM passavam pelo mesmo processo de exposição e manipulação do ceco; porém sem ligadura e perfuração do mesmo. A cada momento era realizada a avaliação clínica pela mensuração da pressão arterial e laboratorial, pela coleta de 1 mL de sangue arterial que foi utilizado para o leucograma e, posteriormente, centrifugado para obtenção do plasma utilizado na mensuração dos marcadores estudados. Foram utilizados kits específicos de procalcitonina e óxido nítrico e o protocolo foi seguido conforme o fabricante. Não houve diferença estatística entre os animais SHAM e os induzidos à sepse experimentalmente. Com relação ao óxido nítrico, houve uma diferença clínica, mas não estatística, com aumento dos valores a cada momento avaliado. Além disso, os animais induzidos apresentaram resultados superiores aos animais SHAM. Com relação à pressão arterial, houve diferença estatística apenas na pressão arterial diastólica que aumentou a cada momento

avaliado. Podemos concluir que o modelo estudado foi capaz de induzir a sepse. Os níveis de procalcitonina e óxido nítrico mantiveram os mesmos padrões nos dois grupos, inclusive no grupo SHAM, podendo estar associados ao início do processo, ou seja, início da síndrome inflamatória sistêmica, devido à manipulação cirúrgica, e a pressão arterial não foi eficaz em prever o início da sepse no tempo estudado.

**Palavras-chave:** biomarcadores, SIRS, hemodinâmica, contagem de leucócitos, kit de ensaio.

## ABSTRACT

The aim of this study was to reproduce an experimental model of sepsis in rats and see if the blood pressure can be a reliable indicator of the beginning of the process of sepsis, comparing this with procalcitonin and nitric oxide. 20 animals anesthetized with halothane inhalation anesthesia were used. The experiment was divided into two phases where the first objective was to stipulate the evaluation time needed to observe the first signs of sepsis. For this, we evaluated the heart rate, respiratory rate and leukocyte count of nine animals in three moments: M1, immediately after manipulation; M2, 2 hours after manipulation; and M3, 4 hours after manipulation. At this stage, there was leukocytosis at 2 hours and decrease of leucocytes 4 hours. From this result, it was stipulated that the evaluation of blood pressure, leukocyte and biomarkers would be held in three stages mentioned above for the second stage. To measure blood pressure, carotid artery dissection was performed and the inserted catheter was secured behind the ear for evaluations within the stipulated time. At this stage, 11 animals were used, 5 and 6 SHAM induced experimental model of sepsis. To induce sepsis, an incision was made in the midline in order to reach the cecum, the foregoing and has its apex connected in "loose" form with nylon and 0 perforated three times with the aid of a hypodermic needle 40x16. The cecum was returned to the cavity and anatomical planes sutured with 3-0 nylon simple interrupted stitches. The animals of the SHAM group went through the same process of exposure and manipulation of the cecum, but without ligation and puncture it. Every moment was performed by clinical evaluation and laboratory measurement of blood pressure, by collecting 1 ml of arterial blood was used for leukocyte counts and subsequently centrifuged to obtain the plasma used in the measurement of the markers. Specific kits procalcitonin and nitric oxide were used and the protocol was followed according to the manufacturer. There was no statistical difference between the SHAM animals and the experimentally induced sepsis. With respect to nitric oxide, there was a clinical difference, but not statistically, with increasing values for each evaluated time. Furthermore, the induced animals show results superior to SHAM animals. With regard to blood pressure, there was statistical difference in diastolic blood pressure increased with each evaluated time. We can conclude that the model studied was able to induce sepsis. Procalcitonin levels and nitric oxide maintained the same patterns in both groups, including the SHAM group, and may be associated with the

beginning of the process, ie, early systemic inflammatory syndrome due to surgical manipulation; and blood pressure was not effective in predicting the onset of sepsis in the study period.

**Keywords:** Biomarkers, SIRS, hemodynamic, leukocyte count, test kit

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico. Fonte: Henkin et al., 2009.....	19
<b>Figura 2:</b> Cânula adaptada para inserção na artéria carótida. A seringa continha solução heparinizada para lavar a cânula a fim de evitar a coagulação do sangue dentro da cânula (Arquivo pessoal).....	31
<b>Figura 3.</b> a. Passagem da cânula arterial na região dorsal do pescoço; b. Dissecção e exposição da artéria carótida; c. Aparência após a sutura da região ventral do pescoço; d. Cânula arterial fixada para a mensuração da pressão arterial invasiva nos momentos pré-estabelecidos (Arquivo pessoal). HV – UENF, 2013.....	32
<b>Figura 4.</b> Ilustração da localização da artéria carótida. Fonte: Pureza, 2006.....	32
<b>Figura 5.</b> Equipamento Animal BioAmp da AdInstruments.....	33
<b>Figura 6.</b> Gráfico extraído do programa LabChart 7 demonstrando a pressão arterial do rato induzido 1, nos três momentos avaliados (M1=0h, M2=2h, M3=4h). O pico superior corresponde a pressão arterial sistólica e o pico inferior a pressão arterial diastólica.....	33
<b>Figura 7.</b> a) Após incisão mediana, localização do ceco para a realização da técnica para indução da sepse; b) Após ligadura do ceco com fio nylon 0, realização dos “furos” para a realização da técnica para indução da sepse (Arquivo pessoal). HV – UENF, 2013.....	34
<b>Figura 8.</b> Indução anestésica com halotano em máscara acoplada ao aparelho de anestesia inalatória .....	35

<b>Figura 9.</b> Diluição das soluções padrão a partir da solução padrão concentrada e da solução padrão de diluição. C1 = 4000ng/L; C2 = 2000ng/L (120µL padrão + 120µL C1); C3 = 1000 ng/L (120µL padrão + 120µL C2); C4 = 500ng/L (120µL padrão + 120µL C3); C5 = 250ng/L (120µL padrão + 120µL C4).....	38
<b>Figura 10.</b> Diluição das soluções padrão a partir da solução padrão concentrada e da solução padrão de diluição. C1 = 4000ng/L; C2 = 2000ng/L (120µL padrão + 120µL C1); C3 = 1000 ng/L (120µL padrão + 120µL C2); C4 = 500ng/L (120µL padrão + 120µL C3); C5 = 250ng/L (120µL padrão + 120µL C4).....	39
<b>Figura 11.</b> Diluição das soluções padrão a partir da solução padrão concentrada e da solução padrão de diluição. C1: 100 µmole/L; C2: 50 µmole/L (500µL padrão + 500µL C1); C3: 25 µmole/L (500µL padrão + 500µL C2); C4: 12,5 µmole/L (500µL padrão + 500µL C3); C5: 6,25 µmole/L (500µL padrão + 500µL C4); e C6: 3,125 µmole/L (500µL padrão + 500µL C5).....	40
<b>Figura 12.</b> Gráfico demonstrando a leucometria dos animais nos três momentos avaliados.....	42
<b>Figura 13.</b> Gráficos demonstrando a frequência respiratória e cardíaca dos animais nos três momentos avaliados.....	42
<b>Figura 14.</b> Gráfico demonstrando os valores da leucometria nos três momentos avaliados e cada momento avaliado comparado com o SHAM.....	43
<b>Figura 15.</b> Gráfico demonstrando os valores da procalcitonina nos três momentos avaliados e cada momento avaliado comparado com o SHAM.....	43
<b>Figura 16.</b> Gráfico demonstrando a evolução do óxido nítrico do SHAM e dos animais induzidos ao modelo experimental de sepse nos três momentos avaliados.....	44

**Figura 17.** Gráfico demonstrando a evolução da pressão arterial sistólica do SHAM e dos animais induzidos ao modelo experimental de sepse nos três momentos avaliados..... 45

**Figura 18.** Gráfico demonstrando a evolução da pressão arterial média do SHAM e dos animais induzidos ao modelo experimental de sepse nos três momentos avaliados..... 45

**Figura 19.** Gráfico demonstrando a evolução da pressão arterial diastólica do SHAM e dos animais induzidos ao modelo experimental de sepse nos três momentos avaliados..... 46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Demonstração dos momentos de avaliação dos animais, a cada duas horas, a partir da instalação do modelo experimental de sepse.....	30
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos grupos experimentais e metodologia utilizada em cada grupo.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

AT III – Antitrombina III

IL – Interleucina

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido Nítrico sintetase

NOSc – Óxido nítrico sintetase constitutiva

NOSe - Óxido nítrico sintetase endotelial

NOSi – Óxido nítrico sintetase induzida

NOSn – Óxido nítrico sintetase neuronal

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

PCT – Procalcitonina

SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TFN- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

UTI – Unidade de terapia intensiva

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Conceitos Gerais.....	18
2.2 Fisiopatologia.....	20
2.3 Epidemiologia.....	21
2.4 Modelo experimental da sepse .....	22
2.5 Diagnóstico .....	24
2.4.1 Biomarcadores.....	26
2.5.1.1 Procalcitonina (PCT).....	27
2.5.1.2 Óxido nítrico (NO).....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	29
4. HIPÓTESES .....	30
5. OBJETIVOS.....	30
6. MATERIAL E MÉTODO.....	30
6.1 Canulação da artéria carótida comum para mensuração da pressão arterial ..	31
6.2 Modelo experimental proposto.....	34
6.3 Anestesia geral inalatória.....	34
6.4 Delineamento experimental.....	35
6.4.1 Etapa 1 .....	35
6.4.2 Etapa 2 .....	36
6.5 Quantificação da Procalcitonina plasmática.....	37
6.6 Quantificação do Óxido Nítrico plasmático.....	39
7. RESULTADOS .....	41
8. DISCUSSÃO .....	46
9. CONCLUSÃO.....	49
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	49
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome causada pela resposta inflamatória sistêmica descontrolada do indivíduo, de origem bacteriana, fúngica ou viral. Caso não seja prontamente tratada, a sepse progride para o choque séptico que ocasiona uma severa depleção de volume intravascular e hipóxia celular, podendo levar à falência múltipla de órgãos e morte (VANZANT et al., 2011).

O termo Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), em 1991, foi reconhecido pela Conferência de Consenso sobre Sepse como qualquer reação inflamatória secundária a agressões, infecciosa ou não. Os parâmetros estabelecidos para caracterização do envolvimento sistêmico são ao menos duas alterações, dentre elas, temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e leucograma (BARBOSA et al., 2004).

Apesar dos sintomas serem conhecidos, na emergência e terapia intensiva, ainda há uma dificuldade em distinguir a causa da sepse em pacientes com sinais clínicos de inflamação aguda (LVOVSCHI et al., 2011).

A distinção de causa é o ponto chave da medicina para um maior sucesso no tratamento da sepse (KIBE et al., 2012).

O reconhecimento e tratamento precoce da sepse permitem um maior sucesso na recuperação e, conseqüentemente, uma taxa maior de sobrevivência (VANZANT et al., 2011).

A presença de determinados componentes na membrana dos patógenos induz a liberação de mediadores inflamatórios específicos, caracterizando a fase inicial da sepse.

Os biomarcadores são capazes de distinguir entre SIRS e várias formas de sepse, como sepse grave e choque séptico, sendo uma estratégia para monitorar mudanças pró-inflamatórias e anti-inflamatórias associadas à resposta do hospedeiro aos patógenos (LVOVSCHI et al., 2011).

Dentre os diversos tipos de biomarcadores existentes, os mais estudados atualmente são as citocinas, a procalcitonina, a proteína C reativa e o óxido nítrico.

As citocinas têm sido amplamente avaliadas como potenciais biomarcadores da sepse, já que são importantes mediadores na fisiopatologia da doença e, em sua maioria, são produzidas imediatamente após a sepse (ANDALUZ-OJEDA et al., 2012).

As citocinas não são estocadas nas células produtoras e, portanto, a síntese é requerida para serem secretadas. Uma vez liberadas, têm uma vida média curta, limitada a sua atividade biológica (Ceccon et al., 2004). Dentre elas, a IL-6 e a IL-8 são as mais relacionadas com a gravidade da resposta à infecção ou à inflamação.

Outras citocinas, como o TNF, IL-1 ou IL-10, correlacionam-se fracamente com o curso clínico de pacientes sépticos e podem não ser detectadas em pacientes com sepse. Elevadas concentrações de pico de IL-6 são encontradas em pacientes que não sobreviveram à sepse. Contudo, essas citocinas estão elevadas em uma série de condições inflamatórias não infecciosas. Vários estudos foram conduzidos para, particularmente, relacionar a IL-6 com o prognóstico de pacientes sépticos. Todavia, o que os autores demonstraram foi que a acurácia diagnóstica da IL-6 para sepse seria limitada, pois se eleva de forma inespecífica em estados inflamatórios sem infecção (BARBOSA et al., 2004). Ainda foi observado que, embora a infusão de IL-6 provoque febre, este mediador não produz efeitos hemodinâmicos ou outros efeitos sistêmicos observáveis (CECCON et al., 2004).

A procalcitonina é um hormônio produzido em condições fisiológicas para conversão em outro hormônio, a calcitonina. A calcitonina está envolvida na regulação metabólica de cálcio e fosfato (SORENG et al., 2011), e é induzida primariamente por infecções generalizadas e pode ajudar a diferenciar SIRS de causas infecciosas e não infecciosas podendo contribuir para o diagnóstico precoce e o acompanhamento da efetividade das medidas terapêuticas (BARBOSA et al., 2004). Este biomarcador apresenta níveis elevados, principalmente em sepse relacionada a bacteremia, pela sua produção extratireoideana nessas condições (SORENG et al., 2011).

A procalcitonina começa a se elevar a partir de três horas e possui uma meia-vida de 24 a 30 horas na circulação, em contraste com outros marcadores da sepse como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) ou a interleucina 6 (IL-6), que retornam aos níveis basais dentro de 6 a 8 horas (PATIL et al., 2012).

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado em resposta a uma invasão microbiana, inflamação aguda e injúria tecidual (NIELSEN et al., 2007). Pode-se dizer que este marcador possui comportamento positivo, ou seja, a concentração sérica se eleva marcadamente logo após a ocorrência de uma agressão ao organismo (ANDRIOLO et al., 2004). Especialmente, a interleucina-6 (IL-6) estimula os hepatócitos a produzir RNAm para produção de proteínas de fase

aguda (fibrinogênio, PCR, amiloide sérico A) (SANTOS et al., 2003). O que determina o valor da proteína C reativa é a taxa de síntese que depende da intensidade do processo inflamatório (BARBOSA et al., 2004). A proteína C reativa se eleva em 12 a 24 horas e necessita de 20 a 72 horas para chegar a um platô, permanecendo elevada por 3 a 7 dias, necessitando de 2 a 3 dias a mais para normalização dos seus níveis, quando comparada à procalcitonina, demonstrando a vantagem desta última no controle da doença (PATIL et al., 2012). Apesar de sua alta sensibilidade, a proteína C reativa ainda é um biomarcador pouco específico, apresentando-se elevada também em situações não infecciosas, como traumas cirúrgicos, doenças inflamatórias e autoimunes (ANDRIOLO et al., 2004).

O óxido nítrico é um vasodilatador que ocorre naturalmente e pequenas quantidades são essenciais para manter o tônus vascular. O óxido nítrico endógeno se origina da L-arginina quando ocorre a liberação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS). A liberação e atuação da NOS sobre a L-arginina acarreta a produção de NO (KNOBEL, 1996). A NOS indispensável para a produção de NO apresenta-se sob três isoformas no organismo: forma constitutiva (cNOS) - ou endotelial (eNOS) -, a forma neuronal (nNOS), ambas cálcio-dependentes, e forma induzível ou induzida (iNOS), que é cálcio-independente (HAUSER et al., 2005). Esta última forma só é liberada em estímulos imunológicos causados pelas endotoxinas e citocinas, diferentemente da cNOS e nNOS que ocorrem em processos fisiológicos. Essa liberação de iNOS que leva ao incremento de óxido nítrico plasmático (KNOBEL, 1996). A produção exacerbada de NO leva a uma intensa vasodilatação e profunda hipotensão que leva a hipoperfusão de todos os órgãos (ISHIKAWA et al., 2012).

Alguns mediadores liberados apresentam um papel proinflamatório, como as citocinas, enquanto outros mediadores exercem a função anti-inflamatória. Além disso, o endotélio vascular exerce uma função na fisiopatologia da sepse, na insuficiência vascular devido às anormalidades na vasomotricidade e na trombomodulação. Quando todo esse processo não é interrompido, a atividade inflamatória é excessiva e mecanismos imunes podem liberar metabólitos tóxicos que causam a síndrome da falência múltipla de órgãos, coagulação intravascular disseminada, depressão miocárdica, vasodilatação refratária, hipotensão e choque séptico.

Os sintomas iniciais da sepse são pouco específicos, visto que a hipertermia é o primeiro sinal encontrado em pacientes em sepse, mas também pode ser

encontrada em outros processos patológicos. Além disso, taquicardia e taquipneia também podem ter outras etiologias que não a sepse em si. A pressão arterial tem um papel importante na evolução da sepse, devido à hipotensão refratária à reposição volêmica observada em paciente em choque séptico. A hipotensão severa também leva a hipoperfusão tecidual e disfunção orgânica observadas nos pacientes em sepse grave.

A forma de diagnóstico mais eficaz tem sido a conjugação de exames clínicos e laboratoriais, o que acaba sendo custoso e demorado na emergência e terapia intensiva. Tanto o diagnóstico precoce da sepse quanto a mudança ou interrupção do seu curso têm sido persistentemente perseguidos pelos pesquisadores nesses últimos anos. Entretanto, a má evolução clínica e/ou a manutenção de elevada mortalidade nos pacientes com sepse ainda não sinalizam para um desfecho próximo ou exitoso na busca de soluções para esse mal.

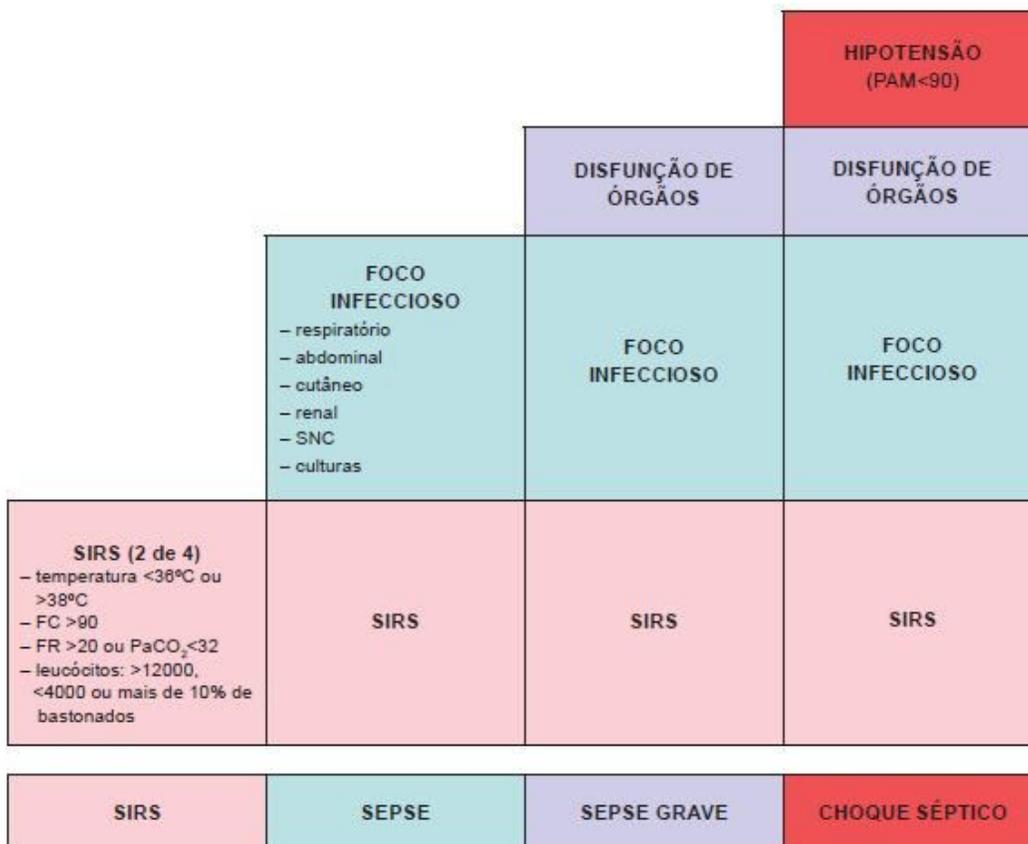
Para tanto, o objetivo do presente trabalho é reproduzir o modelo da sepse experimentalmente, visando a estabelecer uma correlação de alguns mediadores liberados precocemente, como procalcitonina e óxido nítrico, com a pressão arterial em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Esses marcadores foram escolhidos tentando visar aos melhores marcadores que pudessem ser encontrados na corrente sanguínea precocemente, além de provavelmente estarem relacionados com possíveis alterações hemodinâmicas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Conceitos Gerais**

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) é definida pela presença de pelo menos duas das seguintes evidências clínicas: temperatura acima de 38°C ou abaixo de 36°C, taquicardia com frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto, taquipneia com frequência respiratória acima de 20 movimentos respiratórios por minuto, leucocitose acima de 12.000/mm<sup>3</sup>, leucopenia abaixo de 4.000/mm<sup>3</sup> ou mais de 10% de formas jovens de neutrófilos (Figura 1).

A sepse resulta de uma complexa interação entre fragmentos de micro-organismo infectante e a resposta imune pró-inflamatória e pró-coagulante do hospedeiro (HENKIN et al., 2009).



**Figura 1.** Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico. Fonte: Henkin et al., 2009.

É uma resposta sistêmica à infecção que pode desencadear uma cascata de eventos com a liberação de toxinas, leucócitos, citocinas, mediadores inflamatórios, disfunção endotelial, ativação da coagulação sanguínea, deposição intravascular de fibrina, alteração da microcirculação, resultando o dano de órgãos (KNÖBL, 2002).

As características do organismo infectante e a resposta do hospedeiro são as principais variáveis fisiopatológicas da sepse. Dessa maneira, ocorre progressão da sepse quando o hospedeiro não consegue conter a infecção primária por resistência à opsonização, à fagocitose, a antibióticos e à presença de superantígenos (HENKIN et al., 2009).

A resposta inicial do hospedeiro à infecção é um processo complexo que serve para localizar e controlar a invasão bacteriana e iniciar o processo de reparação do dano tecidual. Esse processo inflamatório é acompanhado pela ativação da circulação e fixação de fagócitos, além da geração de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (WATTEL et al., 2000).

Normalmente, o organismo reconhece a invasão de um micro-organismo estranho e começa uma resposta imune para isolar e remover a infecção. Células brancas liberam endotoxinas para iniciar as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

As atividades pró-inflamatórias incluem vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar que permitem a distribuição dos agentes responsáveis por conter a ação dos invasores ao local da infecção e os agentes anti-inflamatórios regulam os mediadores pró-inflamatórios, evitando que se tornem incontroláveis.

Quando esses dois elementos estão balanceados, a inflamação é localizada, a infecção é contida e removida no local do insulto e a integridade do tecido é restaurada (VANZANT et al., 2011).

A sepse acontece quando a resposta inflamatória torna-se sistêmica, passa a envolver tecidos normais distantes do sítio inicial de infecção ou dano. Ela está associada às alterações vasculares caracterizadas pelo aumento da demanda de oxigênio para os tecidos.

Paradoxalmente, a síndrome da resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro pode simultaneamente alterar a capacidade de adequar a oferta à necessidade de oxigênio do tecido e disponibilizar em tempo quando sua necessidade está aumentada.

A diminuição do oxigênio tecidual, relativa ao aumento do seu requerimento, pode resultar em disfunção nos níveis de circulação central, regional e microrregional, reatividade vascular e endotelial, e ativação de leucócitos. Desta forma, a sepse parece estar associada à disfunção microvascular e endotelial precoce, que relacionada à ativação leucocitária, pode promover a falência de órgãos (WATTEL et al., 2000).

## **2.2 Fisiopatologia**

A resposta inflamatória localizada ocorre sempre que um agente agressor, na maioria dos casos um micro-organismo, vence a barreira tecidual. Segue-se uma série de eventos que inclui coagulação, ativação de mastócitos e plaquetas, vasodilatação, edema, migração de neutrófilos e monócitos, responsáveis por produção de citocinas pró-inflamatórias, estímulo da fagocitose e bloqueio do processo por coagulação da circulação circunjacente, resultando na impossibilidade

de acesso à área de novos agentes agressores e fagocitose daqueles presentes no local.

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica é a ampliação dessa sequência de eventos para a circulação sistêmica, o que pode ocorrer por deficiência nas defesas do hospedeiro, pela magnitude do insulto ou, o que é mais frequente, pela combinação desses e outros fatores.

Em nível sistêmico, as alterações vistas na inflamação localizada resultam em vasodilatação sistêmica, aumento da permeabilidade vascular, coagulação intravascular disseminada e danos em vários órgãos-alvo, resultando na síndrome de disfunção múltipla de órgãos (AZEVEDO et al, 2012).

A sepse grave consiste na associação de sepse com disfunção orgânica (HENKIN et al., 2009). Agentes inflamatórios, como o óxido nítrico, produzem vasodilatação dos grandes vasos e as arteríolas perdem a capacidade de promover vasoconstrição em resposta aos hormônios vasorreguladores. Ao mesmo tempo, os neutrófilos aderem às células endotélio capilar e liberam agentes de oxidação, fosfolipases e proteases que danificam a parede capilar. A vasodilatação e perda de fluido capilar produzem uma profunda hipovolemia que compromete a perfusão tecidual (VANZANT et al., 2011).

A oxigenação inadequada leva a um metabolismo anaeróbico que produz ácido láctico, causando um aumento dos níveis de lactato sérico. Essa elevação produz acidose metabólica, a qual é compensada pelo aumento da respiração para eliminar o dióxido de carbono. A taquipneia também aumenta em resposta à hipóxia tecidual. A perfusão inadequada leva a disfunção de órgãos como cérebro, pulmões, rins, fígado e intestino (VANZANT et al., 2011).

A presença de hipotensão, induzida pela sepse ou persistência de alterações da perfusão tecidual após a ressuscitação hemodinâmica adequada, é típica de choque séptico (HENKIN et al., 2009).

## **2.3 Epidemiologia**

A sepse severa e o choque séptico são as maiores causas de admissão e morte nos centros de terapia intensiva, possuindo taxa de mortalidade variando de 30 a 50% em humanos (SHIRAMIZO et al., 2011).

Em todo o mundo, a incidência e a mortalidade da sepse grave e choque séptico continuam altas apesar dos esforços para uniformizar o diagnóstico e tratamento, como as Campanhas de Sobrevivência da Sepse e as recomendações de tratamento imediato e dirigido por metas (ARAÚJO, 2011).

Shiramizo e colaboradores (2011) citam que, nos Estados Unidos, são estimados 751.000 casos e cerca de 215.000 mortes anualmente. Já na Europa, Alberti e colaboradores (2002) estudaram 28 UTIs e encontraram uma incidência de 18,9% de sepse, com uma mortalidade de 44,8% para a sepse grave e 67,9% para choque séptico.

A incidência e mortalidade em pacientes com sepse na América Latina é pouco estudada. No Brasil, a incidência é de 57 a cada 1000 pacientes atendidos por dia e a mortalidade dos portadores de sepse grave e choque séptico é de 47,3 % e 52,2 %, respectivamente (SHIRAMIZO et al., 2011).

## **2.4 Modelo experimental da sepse**

Os roedores são os animais mais utilizados em pesquisa científica por terem características fisiológicas e genéticas semelhantes a dos humanos. Apesar de cada espécie animal possuir mecanismos próprios de controle de parâmetros fisiológicos, ainda é possível que haja variações relacionadas ao sexo, linhagem, genótipo, idade, dieta, manuseio e ambiente (CARVALHO et al., 2009).

Alguns trabalhos visam a estabelecer os parâmetros biológicos e fisiológicos dos ratos a fim de se determinar valores confiáveis para auxílio no controle dos experimentos realizados.

Castello Branco e colaboradores determinaram, dentre outros valores hematológicos, que os valores normais de leucócitos de ratos Wistar variam entre 5000 e 13000 mm<sup>3</sup>. Carvalho e colaboradores (2009) citam que a frequência respiratória de ratos varia de 70 a 115 movimentos respiratórios por minuto e a frequência cardíaca de 250 a 450 batimentos por minuto. Estes mesmos autores observaram que a pressão arterial média, sistólica e diastólica desses animais é de 100 mmHg, 119,5 mmHg e 81,5 mmHg, em média, respectivamente.

O modelo experimental de sepse é um método de estudo, utilizado para avaliar e controlar o fenômeno séptico desde a sua instalação até o desenvolvimento da falência terminal dos órgãos e sistemas. A morte ocorre em virtude da disfunção

de múltiplos órgãos e sistemas secundária à manutenção da sepse intraperitoneal com focos residuais de infecção ou em decorrência da translocação bacteriana e da liberação de mediadores inflamatórios (TRAMONTE et al., 2004).

Os modelos animais devem mimetizar o passo a passo e severidade da sepse humana, reproduzir os estágios hemodinâmicos e imunológicos, mimetizar os achados histológicos nos órgãos frequentemente afetados e minimizar variabilidade entre os animais (DOI et al., 2009).

São conhecidos três modelos experimentais para indução da sepse: a administração endovenosa da bactéria viva ou componentes microbianos; administração intraperitoneal da bactéria viva ou de componentes microbianos e modelos de injúria do intestino com consecutiva liberação de flora bacteriana. Este último ainda pode ser realizado de duas formas distintas: ligação e perfuração do ceco ou introdução de cateter no cólon ascendente.

O modelo de injúria com liberação da flora bacteriana foi descrito inicialmente por Wichtermann e colaboradores em 1980 e Baker e colaboradores, em 1983 e é o que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos. Nesse modelo, realiza-se a perfuração da parede intestinal e o conteúdo cólico é liberado gradativamente para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (BENJAMIN, 2001).

Na presença do patógeno, dois componentes da resposta imune são ativados: o inato e o adquirido. A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa contra a infecção. Nela, uma grande variedade de patógenos é reconhecida (de maneira inespecífica) e a resposta, desencadeada pelo reconhecimento, é imediatamente realizada por substâncias solúveis humorais celulares (incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células natural "killer"). Estas deflagram a resposta imune adquirida. Em contraste à resposta inata, a resposta imune adquirida é caracterizada pelo reconhecimento altamente específico de antígenos e pela capacidade do sistema de armazenar "memória imunológica". A imunidade adquirida, mediada por linfócitos T e B, reconhece com alta afinidade micro-organismos através da combinação de receptores com estruturas da parede microbiana (PORTELLA, 2010).

## 2.5 Diagnóstico

Infecção e sepse são acompanhadas por sinais clínicos e laboratoriais, como mudanças na temperatura corporal, leucocitose e taquicardia. Porém, esses sinais e sintomas de inflamação sistêmica, além de não serem específicos ou sensíveis, ainda podem resultar de causas não infecciosas. Sendo assim, o intensivista deve estar atento aos indicadores clínicos e laboratoriais da inflamação (BARBOSA et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que o diagnóstico e tratamento precoces da sepse grave diminuem a mortalidade e morbidade (KENT et al., 2012).

Na última década, inúmeros marcadores têm sido sugeridos para o diagnóstico precoce da sepse, dentre eles está a dosagem sérica de algumas citocinas - interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF), de seus respectivos receptores solúveis (receptor do TNF), proteínas de fase aguda (proteína C reativa) e procalcitonina (MOSCOVITZ et al., 1994).

A observação e o cuidado de pacientes nas UTIs pediátricas e neonatais têm mostrado que os sinais e sintomas da sepse são muito variáveis, de acordo com as diferentes faixas etárias do paciente, não podendo se restringir a desvios de apenas algumas variáveis fisiológicas. Assim, quanto mais jovem a criança, mais inespecíficos são os sintomas da sepse. Nenhum sinal clínico é sensível ou específico o suficiente para indicar infecção grave, especialmente em pacientes muito doentes (CARVALHO et al., 2003).

A recente Conferência Internacional sobre Definição de Sepse ampliou a lista de possíveis sinais clínicos e laboratoriais da sepse, contemplando inúmeros indicadores de infecção grave na criança. Assim, para o clínico ou intensivista, o diagnóstico de sepse está baseado em um alto índice de suspeita, exigindo uma minuciosa coleta de informações sobre o estado atual e os antecedentes médicos do paciente, uma boa avaliação clínica, alguns exames laboratoriais, além de um rigoroso acompanhamento clínico do paciente. Frente a uma suspeita de infecção grave, deve ser excluída a possibilidade de se tratar de alguma outra condição inflamatória sistêmica não infecciosa (CARVALHO et al., 2003).

Os principais parâmetros clínicos e laboratoriais, utilizados para monitorização da resposta inflamatória, são temperatura corporal, leucograma e coagulação; porém são pouco específicos quanto à evolução para sepse e prognóstico do paciente. O aumento da temperatura corporal é, geralmente, o primeiro sinal de inflamação sistêmica. Durante a evolução para sepse, o paciente pode apresentar hipotermia, a qual é um sinal prognóstico ruim.

A contagem de leucócitos pode estar aumentada, podendo indicar infecção; no entanto se sabe que a leucocitose pode estar presente em outras situações, como hemorragias gastrointestinais, transfusão sanguínea e uso de corticosteroides.

O distúrbio de coagulação é observado nos pacientes sépticos, com diminuição dos níveis de antitrombina III (AT III) e D-dímeros, resultando em hipercoagulabilidade. A diminuição precoce e rápida de AT III indica um prognóstico desfavorável. A trombocitopenia também pode ser observada em grande parte dos pacientes sépticos (BARBOSA et al., 2004).

A avaliação laboratorial ou complementar é capaz de revelar dois aspectos distintos da sepse. O primeiro é o que se refere à busca ou identificação do agente agressor, através do rastreamento microbiológico do paciente, e o segundo diz respeito à identificação de alterações metabólicas ou da homeostasia, indicativas de comprometimento sistêmico e de órgãos específicos.

A avaliação microbiológica inclui exames diretos e cultura de sangue (dois ou mais), de urina, de liquor, de fezes, de secreções, de aspirado de intestino delgado e de exsudatos, preferencialmente antes da utilização de terapias antimicrobianas. O liquor sempre deve ser obtido, especialmente no recém-nascido e nos lactentes jovens, tendo o cuidado de obtê-lo com segurança, isto é, sem colocar em risco o paciente. No caso de pacientes hospitalizados, a coleta de material para cultura deve incluir também cateteres venosos ou arteriais (sangue de cateteres), sonda vesical, tubo traqueal ou traqueostomia (aspirado traqueal) e suturas ou cicatrizes de procedimento cirúrgico recente (CARVALHO et al., 2003).

Apesar dos grandes esforços no sentido de isolar os microrganismos, em média, as culturas de sangue são positivas só em 34% dos pacientes “sépticos”, variando entre 9 e 64%.

No trabalho citado, os autores afirmavam não saber quantos desses episódios eram de sepses não bacterêmicas ou falhas nos métodos de cultivo e identificação microbiológica ou ainda SIRS não infecciosas (CARVALHO et al., 2003).

Na suspeita de sepse de paciente com longa permanência na UTI, torna-se mandatória a investigação para infecção sistêmica causada por fungo. Atualmente, os fungos e, especialmente, as espécies de *Cândida* são responsáveis por cerca de 5% das sepses. A presença de fatores de risco adicionais aumenta a chance de infecção fúngica, tais como utilização de múltiplos esquemas de antibióticos, antibióticos de largo espectro, de nutrição parenteral, presença prolongada de cateter central e colonização de trato digestivo por *Cândida* (BOCHUD et al., 2001).

A avaliação laboratorial, para identificação de comprometimento sistêmico, inclui desde a busca de indicadores de resposta inflamatória no sangue periférico (mediadores endógenos, indicadores de fase aguda) até a pesquisa de indicadores de distúrbios orgânicos e metabólicos, visando às terapias de suporte. Os indicadores da presença da resposta inflamatória sistêmica, na sua maioria, carecem de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da sepse, mas podem ter valor prognóstico e de acompanhamento da resposta à terapêutica. Aumento de lactato sérico, de citocinas séricas, de fator estimulante das colônias de granulócitos e de óxido nítrico plasmático (através dos níveis plasmáticos de nitrato/nitrito) pode ser indicador precoces de SIRS, ainda que a maioria deles não esteja disponível de forma rápida (BOCHUD et al., 2001).

### **2.5.1 Biomarcadores**

Biomarcadores têm sido sugeridos para auxiliar um diagnóstico precoce e para o início precoce de terapia adequada em pacientes com sepse em UTI. Um biomarcador é um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas para uma intervenção terapêutica (SANKAR et al., 2012).

Um biomarcador ideal deve ser fácil de medir, ser facilmente encontrado, possuir preço acessível e permitir um diagnóstico altamente específico e sensível de sepse, além de quantificar a gravidade na ausência de sinais clínicos e monitorização da evolução da doença e da resposta à terapia (SANKAR et al., 2012). Embora 178 biomarcadores estejam descritos na literatura, muitos não são utilizados na prática clínica pela falta de sensibilidade e especificidade (SANKAR et al., 2012).

### 2.5.1.1 Procalcitonina (PCT)

Produzido pelo gene CALC-1 e localizado no cromossomo 11, o RNAm é traduzido em preprocalcitonina. O produto dessa tradução é modificado em procalcitonina, um hormônio de 116 aminoácidos que, posteriormente, é convertido em um hormônio ativo de 32 aminoácidos, a calcitonina, a qual está envolvida na regulação metabólica de cálcio e fosfato (SORENG et al., 2011). Os níveis de procalcitonina (PCT) aumentam consideravelmente na sepse, principalmente em infecções bacterianas causadas por agentes gram-negativos (PALMIERE et al., 2013).

Jin et al. (2009) afirma que, em infecções virais, o aumento dos níveis de PCT é mínimo, quando comparado a infecções bacterianas. Já Soreng et al. (2011) relata estudos os quais demonstram que células infectadas por vírus frequentemente sintetizam IFN- $\gamma$ , que poderiam contribuir com a supressão de indução da PCT. Ambas as afirmações provam que a PCT é um biomarcador importante no diagnóstico diferencial da etiologia da sepse.

Em pacientes saudáveis, a procalcitonina é secretada quase exclusivamente pelas células C da tireoide (SORENG et al., 2011) e, nessas condições, as concentrações séricas de PCT são muito baixas (0,05 ng/ml) (ARKADER, 2003; LIU et al., 2013). Já na septicemia, particularmente aquela associada à bacteremia, pode haver ativação de uma via alternativa de produção de procalcitonina, aumentando seus níveis séricos. Alguns tecidos os quais podem produzir a PCT, nesses casos, são o pulmão, colon, baço, dentre outros (SORENG et al., 2011). Níveis acima de 2 ng/ml mostram a susceptibilidade do paciente a desenvolver sepse grave ou choque séptico (LIU et al., 2013).

A PCT é considerada um bom marcador clínico, pois apresenta alta especificidade e sensibilidade (SENER et al., 2013) e seus níveis séricos aumentam em 3 horas, tendo seu pico em torno de 6 a 12 horas, além de ser altamente estável no soro e no plasma (LIU et al., 2013). Possui uma meia-vida de 24 a 30 horas na circulação, em contraste com outros marcadores da sepse, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) ou a interleucina 6 (IL-6), que retornam aos níveis basais dentro de 6 a 8 horas (PATIL et al., 2012). Fioretto et al. (2007) observou que a PCT foi capaz de determinar a gravidade dos pacientes no momento da admissão, diferenciando crianças com sepse, daquelas já em choque séptico. Estudos

mostram que os níveis séricos de procalcitonina dentro das primeiras 48 horas, principalmente nas 14 a 24 horas podem ser usados para prever o prognóstico e a mortalidade para pacientes com infecção severa (LIU et al., 2013).

Estudos recentes demonstraram que a procalcitonina é o melhor parâmetro para identificação de sepse, quando comparada a outras variáveis clínicas, bioquímicas e bacteriológicas testadas, inclusive a IL-6 e a proteína C reativa (LIU et al., 2013).

### **2.5.1.2 Óxido nítrico (NO)**

O óxido nítrico endógeno se origina da L-arginina quando ocorre a liberação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS). A liberação e atuação da NOS sobre a L-arginina acarreta a produção de NO (KNOBEL, 1996).

Muitas células são capazes de sintetizar o NO através de hemoproteínas da família citocromo P450-like, chamadas de NO sintases (NOS). A NOS é dependente de O<sub>2</sub>, NADPH, flavinas e biopterinas para exercerem sua atividade (FILHO et al., 2000).

A NOS é indispensável para a produção de NO e possuem três isoformas específicas, sendo uma NOS induzida (iNOS), cálcio-independente, e duas NOS constitutivas (cNOS), cálcio-dependentes, sendo estas duas designadas NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS). A NOS difere quanto ao peso molecular, a forma de ativação e a capacidade de síntese de NO (HAUSER et al., 2005).

As duas cNOS são classificadas como cálcio-dependentes, porque necessitam de Ca<sup>2+</sup> para sua ativação, ou seja, é necessário determinada concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular para existir a atividade enzimática, caso ocorra redução nos níveis de Ca<sup>2+</sup>, as enzimas tornam-se inativas. Já a iNOS é classificada como cálcio-independente, pois sua ativação não é regulada pela presença de Ca<sup>2+</sup> (VIEIRA et al., 2007).

A nNOS ou Isoforma I é expressa no tecido nervoso, tanto em neurônios adultos como nos neurônios em desenvolvimento e também nos astrócitos. Tem uma importante participação fisiológica como neurotransmissor, além de intermediar o acoplamento entre o metabolismo neural e o fluxo sanguíneo cerebral (KNOBEL, 1996).

A eNOS ou Isoforma III é principalmente expressa no endotélio, mas também pode ser encontrada em neurônios e miócitos cardíacos. O código genético

responsável pela isoforma III foi clonado a partir de células endoteliais de bovinos e humanos, confirmando o local preferencial de produção e ação (VIEIRA et al., 2007).

A iNOS ou Isoforma II não é expressa sob condições normais; todavia é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em várias células como macrófagos, neutrófilos, células de Kupffer e hepatócitos (VIEIRA et al., 2007). Nestas circunstâncias, o NO é produzido a partir da L-arginina através da ação da iNOS que, por sua vez, é uma enzima produzida independentemente do cálcio (KNOBEL, 1996). Esta isoforma requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a cNOS e a nNOS e sua produção continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra morte celular (VIEIRA et al., 2007).

A expressão da iNOS é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa resultante de uma infecção ou dano tecidual. As altas concentrações de NO, tóxicas para micróbios, parasitos e células tumorais, podem também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios e autoimunes (VIEIRA et al., 2007).

A primeira função atribuída ao NO, como mediador biológico, foi a sua capacidade para produzir vasodilatação, mas hoje também se acredita na sua função na participação do controle da temperatura corporal durante condições fisiológicas e patológicas (PEREIRA et al., 2014).

Segundo Ishikawa et al. (2012), na sepse, a superprodução de NO também implica a vasodilatação e hipotensão profunda, as quais levam a uma redução da pressão de perfusão dos órgãos, depressão miocárdica e aumento da permeabilidade vascular.

O aumento de NO pode exercer um papel de proteção na sepse pela sua ação antimicrobiana e citotóxica, porém altos níveis também induzem a disfunção orgânica e a morte celular (ISHIKAWA et al., 2012).

### **3. JUSTIFICATIVA**

O presente trabalho justifica-se pela escassez de informações no que se refere a métodos alternativos no diagnóstico clínico da sepse. O delineamento experimental de indução de sepse por ligadura e punção do ceco pretende

estabelecer a mensuração da pressão arterial como método diagnóstico pela facilidade, rapidez e preço acessível como alternativa na emergência e terapia intensiva. Além disso, a correlação das possíveis alterações hemodinâmicas com o aumento nos níveis de procalcitonina e óxido nítrico ajuda a auxiliar na detecção das fases da sepse.

#### **4. HIPÓTESES**

Diante de alguns trabalhos, fica provado que ratos são considerados modelos experimentais confiáveis, capazes de induzir a sepse. Dentro dessa mesma linha, a pressão arterial pode ser um método simples e confiável de se identificar precocemente o processo da sepse, sendo a procalcitonina e o óxido nítrico uma ferramenta analítica viável para a confirmação da correlação entre sepse e pressão arterial.

#### **5. OBJETIVOS**

- a) Reproduzir o modelo experimental de sepse no rato.
- b) Verificar o comportamento dos níveis procalcitonina e óxido nítrico durante o período experimental.
- c) Verificar se a pressão arterial pode ser um indicador confiável do início do processo da sepse, comparando este dado com a quantificação dos marcadores da sepse.

#### **6. MATERIAL E MÉTODO**

O presente trabalho foi submetido à análise pela Comissão de Ética de Uso Animal da instituição e aprovado sob número de protocolo 161.

Foram realizados testes em 20 ratos (*Rattus norvegicus wistar*) machos, pesando entre 250 e 300g, mantidos num ambiente com temperatura controlada a 19 °C e umidade de 50 a 60%, ficando em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e comida foram oferecidas *ad libitum*.

## 6.1 Canulação da artéria carótida comum para mensuração da pressão arterial

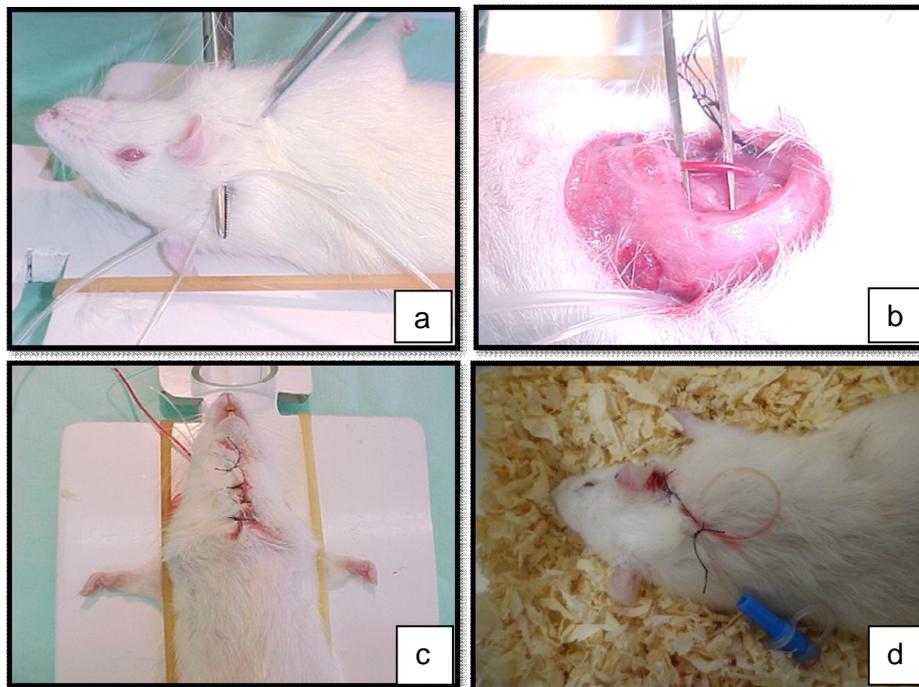
Todos os animais foram posicionados em decúbito dorsal e contidos para canulação da artéria carótida e realização do procedimento cirúrgico de indução da sepse. A cânula utilizada foi preparada a partir de uma sonda uretral nº4, acoplada a um cateter intravenoso PE30 da Cole-Parmer do Brasil® (Figura 2).



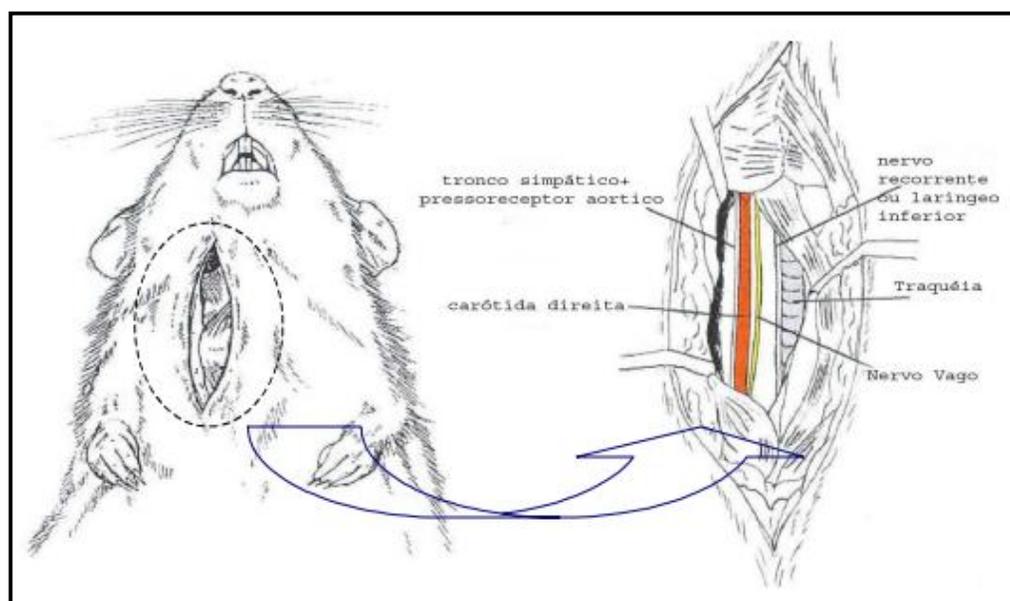
**Figura 2.** Cânula adaptada para inserção na artéria carótida. A seringa continha solução heparinizada para lavar a cânula a fim de evitar a coagulação do sangue dentro da cânula (Arquivo pessoal).

Para manutenção da cânula, foi realizada uma incisão na região cervical ventral do pescoço e, com o auxílio de uma pinça hemostática, a musculatura foi dissecada, em direção à orelha do animal, onde foi feita uma incisão para passagem e fixação da cânula na região cervical dorsal do pescoço (Figura 3a). O posicionamento da cânula neste local é importante para manutenção da mesma após o retorno da anestesia, permitindo posteriores avaliações da pressão arterial (Figura 3d). Continuou-se a dissecação dos músculos esterno hioideo e esternocleidomastóideo para exposição da artéria carótida comum esquerda, localizada paralelamente à traqueia (Figura 3b). A artéria foi dissecada para separação do nervo vago (Figura 4) e iniciou-se a implantação da cânula heparinizada com uma solução de heparina sódica e cloreto de sódio 0,9% para mensuração da pressão arterial invasiva (Figura 3c). A heparinização da cânula é de suma importância, uma vez que evita a coagulação do sangue dentro da cânula,

impedindo ou dificultando a avaliação da pressão arterial e a coleta de sangue arterial nos momentos estipulados.

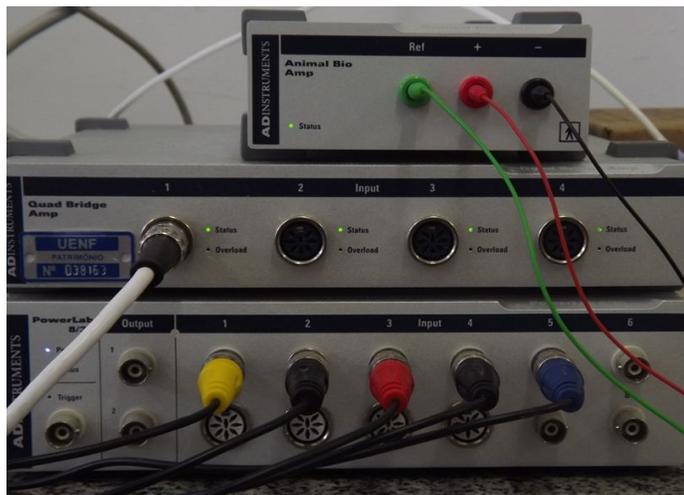


**Figura 3.** a. Passagem da cânula arterial na região dorsal do pescoço; b. Dissecção e exposição da artéria carótida; c. Aparência após a sutura da região ventral do pescoço; d. Cânula arterial fixada para a mensuração da pressão arterial invasiva nos momentos pré-estabelecidos (Arquivo pessoal). HV – UENF, 2013

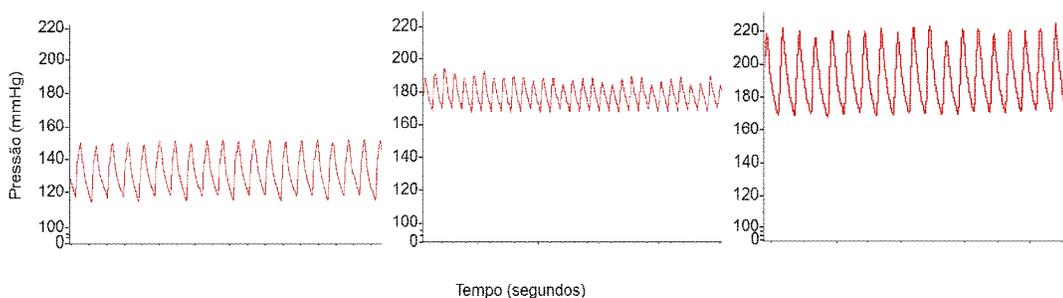


**Figura 4.** Ilustração da localização da artéria carótida. Fonte: Pureza, 2006.

A cânula inserida foi conectada ao sensor do equipamento BioAmp (Figura 5), que codifica as informações de pressão arterial e amplifica o sinal na forma de gráficos para o computador, permitindo a análise destes dados pelo programa LabChart 7 (Figura 6).



**Figura 5.** Equipamento Animal BioAmp da AdInstruments

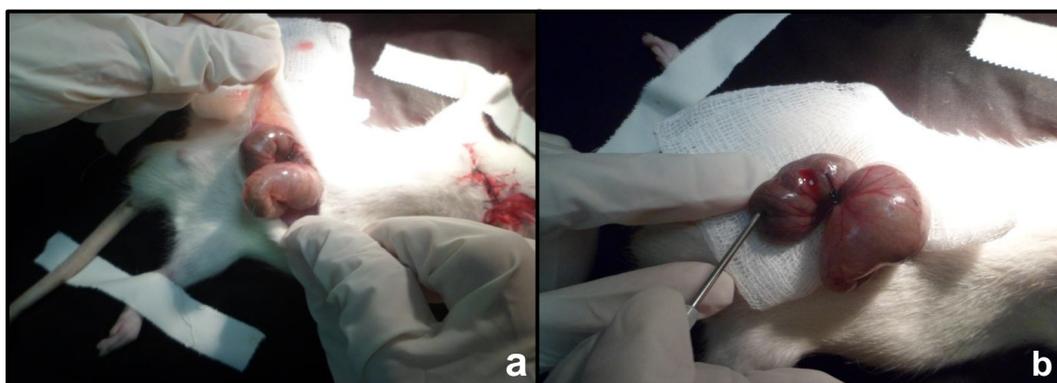


**Figura 6.** Gráfico extraído do programa LabChart 7 demonstrando a pressão arterial do rato induzido 1, nos três momentos avaliados (M1=0h, M2=2h, M3=4h). O pico superior corresponde à pressão arterial sistólica e o pico inferior à pressão arterial diastólica.

## 6.2 Modelo experimental proposto

Todos os procedimentos realizados, para indução da sepse, foram realizados pela mesma pessoa a fim de minimizar possíveis divergências na metodologia empregada.

O modelo de ligadura e punção do ceco consistiu em epilação e antissepsia da região abdominal para a realização da laparotomia e exposição do ceco. O ápice do ceco é encontrado, onde uma ligadura "frouxa" com fio nylon 0 é realizada, simulando uma bolsa de tabaco, a fim de manter tal porção repleta de conteúdo fecal. Foram feitos três "furos" com auxílio de agulha hipodérmica 40x16 (Figura 7). A ligadura estimula o peristaltismo, facilitando o extravasamento fecal na cavidade abdominal através dos furos realizados. O ceco foi devolvido à cavidade, e procedeu-se a sutura dos planos anatômicos com fio inabsorvível (nylon) 3-0 em pontos simples separados.



**Figura 7.** a) Após incisão mediana, localização do ceco para a realização da técnica para indução da sepse; b) Após ligadura do ceco com fio nylon 0, realização dos “furos” para a realização da técnica para indução da sepse (Arquivo pessoal). HV – UENF, 2013.

## 6.3 Anestesia geral inalatória

A indução anestésica foi realizada com o auxílio de máscara inalatória, elaborada a partir de uma garrafa “pet” e manutenção anestésica contou com o auxílio de uma máscara menor, produzida a partir de uma seringa de 20 ml e preenchida com cal soldada a fim de minimizar a reinalação de CO<sub>2</sub>. Durante todo o procedimento a anestesia foi mantida com halotano (Figura 8).



**Figura 8:** Indução anestésica com halotano em máscara acoplada ao aparelho de anestesia inalatória. a - Indução; b – Manutenção (Arquivo pessoal).

## 6.4 Delineamento experimental

O presente trabalho foi dividido em duas etapas: A primeira tinha por finalidade determinar o ponto de partida para avaliação da procalcitonina e óxido nítrico a partir do início dos indícios da sepse e a segunda consistia na avaliação dos biomarcadores estudados nos animais operados e SHAM.

### 6.4.1 Etapa 1

Todos os ratos foram anestesiados, canulados e submetidos ao modelo de ligadura e exposição do ceco conforme descrito anteriormente. Nesta etapa, nove ratos foram utilizados, avaliados quanto à frequência cardíaca e respiratória, pressão arterial e leucometria. As avaliações ocorreram em três momentos: logo após o término do procedimento de implantação da cânula e indução experimental da sepse, duas horas após e quatro horas após o primeiro momento (Tabela 1).

Tabela 1. Demonstração dos momentos de avaliação dos animais, a cada duas horas, a partir da instalação do modelo experimental de sepse

<b>Momentos</b>	<b>Tempo</b>	<b>Procedimento</b>
<b>1</b>	0 h	Imediatamente após o procedimento de canulação e indução de sepse
<b>2</b>	2h	Duas horas após o procedimento de canulação e indução de sepse
<b>3</b>	4h	Quatro horas após o procedimento de canulação e indução de sepse

A frequência respiratória foi avaliada por observação e contagem visual dos movimentos respiratórios por minuto. A frequência cardíaca foi estipulada a partir da derivada da pressão arterial, ambas obtidas pelo programa LabChart 7 a partir do sensor acoplado à cânula presente na artéria carótida. Já a leucometria foi avaliada a partir da coleta de 1mL de sangue arterial pela cânula inserida. O sangue foi centrifugado para obtenção do plasma e contagem dos leucócitos.

Ao final das 4 horas de avaliação, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica de cetamina e diazepam.

#### **6.4.2 Etapa 2**

Nesta etapa foram utilizados onze ratos distribuídos em blocos casualizados. Todos foram submetidos à canulação da artéria carótida e laparotomia descritos acima.

As avaliações foram realizadas nos mesmos momentos demonstrados na primeira etapa, porém, nesta etapa, as avaliações consistiam em mensuração da pressão arterial, leucometria e mensuração dos níveis de procalcitonina (*Rat Procalcitonin (PCT) ELISA Kit*) e óxido nítrico (*Nitric oxide (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) detection kit*) plasmáticos.

Os ratos foram divididos em dois grupos, sendo um grupo controle (falso operado ou SHAM) e outro experimental (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais e metodologia utilizada em cada grupo

<b>Grupo 1: SHAM (n=5)</b>	<b>Grupo 2: INDUZIDOS (n=6)</b>
- Laparotomia e exposição do ceco	- Laparotomia e exposição do ceco
- Manipulação	
- Devolução à cavidade, sem realização da ligadura e punção cecal	- Realização do modelo de ligadura e punção cecal

Foi coletado 1 mL de sangue a cada momento para realizar centrifugação para a obtenção do plasma para a leucometria, análise de procalcitonina e óxido nítrico. Após cada coleta de sangue, foi realizada reposição do volume com solução salina a 0,9% para minimizar possíveis efeitos hipotensores decorrentes da hipovolemia.

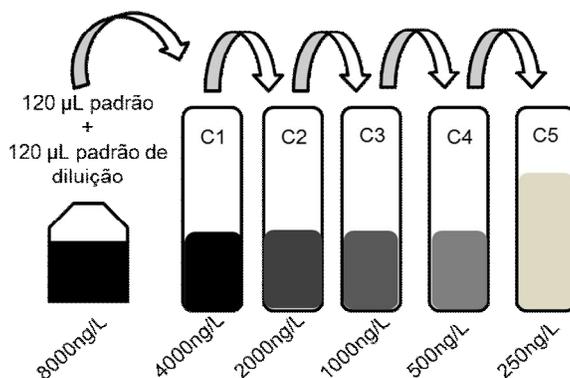
Ao final das 4 horas de avaliação, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica de cetamina e diazepam.

### **6.5 Quantificação da Procalcitonina plasmática**

Para quantificação da procalcitonina nas amostras, foi utilizado o *Rat Procalcitonin (PCT) ELISA Kit*, o qual utiliza a tecnologia de sanduíche duplo de anticorpo com Biotina.

O procedimento de obtenção dos valores de procalcitonina foi realizado de acordo com o protocolo estipulado pelo fabricante, que consistia nas etapas que se seguem.

A diluição das soluções padrão seguiu conforme demonstrado a seguir (Figura 9).



**Figura 9.** Diluição das soluções padrão a partir da solução padrão concentrada e da solução padrão de diluição. C1 = 4000 ng/L; C2 = 2000 ng/L (120 µL padrão + 120 µL C1); C3 = 1000 ng/L (120 µL padrão + 120 µL C2); C4 = 500 ng/L (120 µL padrão + 120 µL C3); C5 = 250 ng/L (120 µL padrão + 120 µL C4).

Após as diluições, foi estipulado o número de poços necessários e foi realizada a distribuição das soluções padrão do branco e das amostras na placa. Todas as amostras e soluções padrão foram realizadas em duplicata.

Nos poços do branco, foi adicionado o anticorpo anti PCT e a estreptavidina. Nesses poços não se adicionou nenhuma amostra. Nos poços das soluções padrão, foram adicionados 50 µl das soluções previamente diluídas e 50 µl de estreptavidina. Nos poços das amostras, foram adicionados 40 µl da amostra, 10 µl de anti PCT e 50µl de estreptavidina.

Após a distribuição de todas as soluções, realizou-se a mistura com movimentos suaves na placa para homogeneização. A placa foi incubada a 37°C por 60 minutos. Em seguida foi realizada a preparação da solução de lavagem contida no kit, diluindo-a na proporção 1:30 com água destilada.

Passados os 60 minutos de incubação, o líquido contido na placa foi descartado e cada poço foi preenchido com a solução de lavagem previamente preparada e após 30 segundos, o líquido dos poços foi descartado. Este procedimento foi repetido 5 vezes e a placa foi seca.

Para promover a coloração, foram adicionados 50µl da solução cromatógena A em cada poço e, posteriormente, a solução cromatógena B. Após homogeneização, a placa foi incubada por mais 10 minutos a 37°C, protegida da luz. Foram adicionados 50µl da solução de parada em cada poço da placa para interromper a reação.

O cálculo do zero e média da absorbância de cada poço foi realizado pela leitura da placa e pelo leitor de placa a 450 nm em um período máximo de 10 minutos.

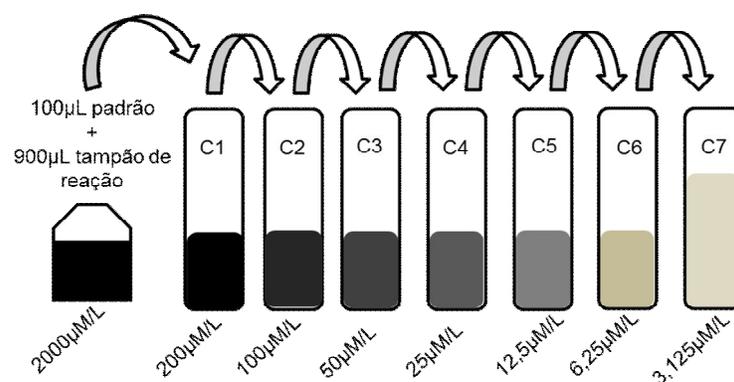
De acordo com as concentrações padrões e dos valores de absorbância, a curva padrão é desenhada e sua equação de regressão linear descoberta.

As médias dos poços em duplicata foram calculadas e o valor do branco subtraído destes valores, que então foram substituídos ao 'x' da equação a fim de mensurar a quantidade de procalcitonina em cada amostra.

## 6.6 Quantificação do Óxido Nítrico plasmático

Para a quantificação de óxido nítrico, foi utilizado o *Nitric oxide (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) detection kit* que quantifica nitrito e nitrato de fluidos biológicos. O kit contém duas placas para quantificação de nitrito e nitrato.

O primeiro passo foi diluir o plasma com a solução de reação da proporção de 1:10. Para encontrar a curva padrão de nitrito, foi realizada a diluição da solução tampão com a solução padrão de 2000  $\mu\text{mole/L}$  em 7 tubos. A diluição da solução para obtenção da curva padrão de nitrito foi realizada conforme demonstrada abaixo (Figura 10).

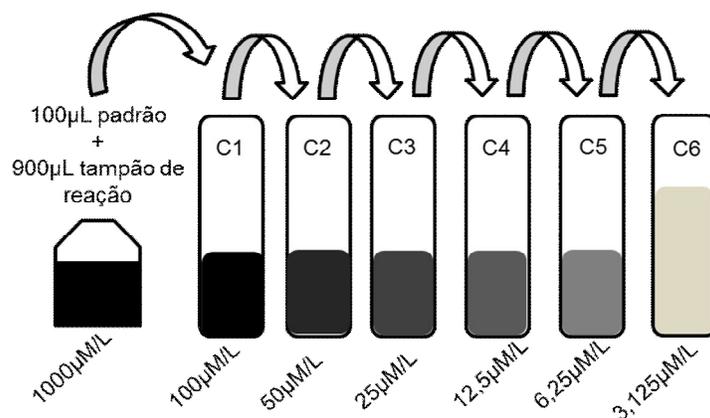


**Figura 10.** Diluição das soluções padrão a partir da solução padrão concentrada e da solução padrão de diluição. C1: 200  $\mu\text{mole/L}$ ; C2: 100  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C1); C3: 50  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C2); C4: 25  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C3); C5: 12,5  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C4); C6: 6,25  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C5); e C7: 3,125  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C6).

Após as diluições, foi estipulado o número de poços necessários e foi realizada a distribuição das soluções padrões do branco e das amostras na placa. Todas as amostras e soluções padrões foram realizadas em duplicata.

Nos poços do branco, foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de tampão de reação. Nos poços da curva padrão, foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  do padrão de nitrito e 50  $\mu\text{l}$  de tampão de reação. Nos poços destinados as amostras, foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  da amostra e 50  $\mu\text{l}$  da solução padrão. Em todos os poços, exceto no branco, foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  do reagente Griess 1 e 50  $\mu\text{l}$  do reagente Griess 2. Após a homogeneização da placa e incubação a 10 minutos em temperatura ambiente, a leitura a 540 nm foi realizada no leitor de placa.

Para encontrar a curva padrão de nitrato, foi realizada a diluição da solução tampão com a solução padrão de 1000  $\mu\text{mole/L}$  em 6 tubos. A diluição da solução, para obtenção da curva padrão de nitrato, foi realizada conforme demonstrada abaixo (Figura 11).



**Figura 11.** Diluição das soluções padrão a partir da solução padrão concentrada e da solução padrão de diluição. C1: 100  $\mu\text{mole/L}$ ; C2: 50  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C1); C3: 25  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C2); C4: 12,5  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C3); C5: 6,25  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C4); e C6: 3,125  $\mu\text{mole/L}$  (500  $\mu\text{L}$  padrão + 500  $\mu\text{L}$  C5)

Após as diluições, foi estipulado o número de poços necessários e foi realizada a distribuição das soluções padrões do branco e das amostras na placa. Todas as amostras e soluções padrões foram realizadas em duplicata.

Nos poços do branco, foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de tampão de reação. Nos poços da curva padrão, foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  do padrão de nitrato. Nos poços destinados às amostras, foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  da amostra. Em todos os poços da

placa, foram adicionados 25µl de NADH e 25 µl de nitrato redutase. Após a homogeneização da placa, ela foi coberta e incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados, em todos os poços, exceto no branco, 25 µl do reagente Griess 1 e 25 µl do reagente Griess 2. A placa foi homogeneizada novamente e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e a leitura realizada a 540 nm pelo leitor de placa.

De acordo com as concentrações padrões e dos valores de absorvância, as curvas padrões de nitrito e nitrato foram desenhadas e suas respectivas equações de regressão linear descobertas.

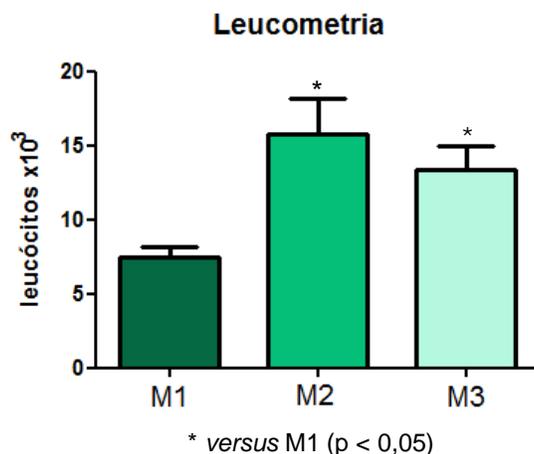
As médias dos poços em duplicata foram calculadas e o valor do branco subtraído destes valores, que então foram substituídos ao 'x' da equação a fim de mensurar a quantidade de nitrito e nitrato em cada amostra. Após a descoberta dos valores reais de nitrito e nitrato, estes foram somados para encontrar o valor de óxido nítrico em cada amostra.

Os dados foram compilados e analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e as médias das variáveis foram avaliadas através do teste de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) pelo programa GraphPad Prisma 5.0.

## 7. RESULTADOS

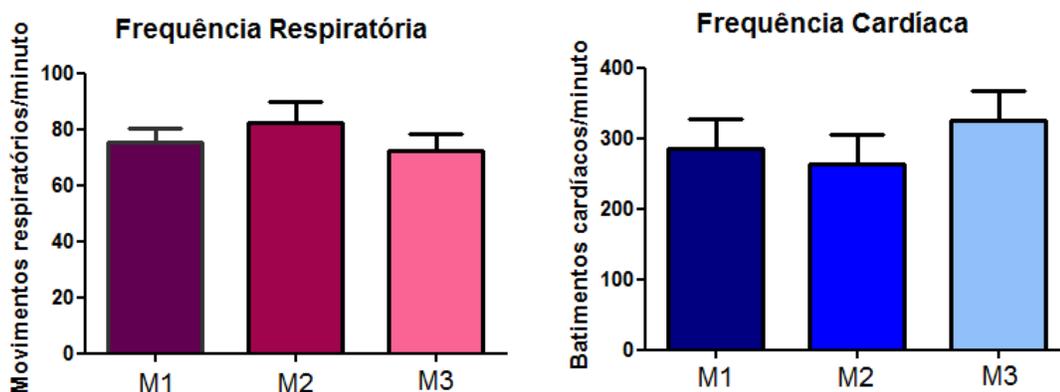
Na primeira etapa, foi avaliada a frequência cardíaca e respiratória, além da leucometria. Observou-se diferença estatística na análise da leucometria entre M1 e M2 e entre M1 e M3, não havendo diferença estatística entre M2 e M3 (Figura 12).

No primeiro momento, todos os animais avaliados apresentavam a leucometria dentro dos parâmetros esperados para a espécie [5000 a 13000 ( $\times 10^3$ )], enquanto, no segundo momento, todos os animais apresentaram aumento dos leucócitos, sendo que 5 dos 9 animais apresentavam leucometria superior ao valor máximo de referência para a espécie, demonstrando a leucocitose. No terceiro momento, 6 animais apresentaram redução destes valores.



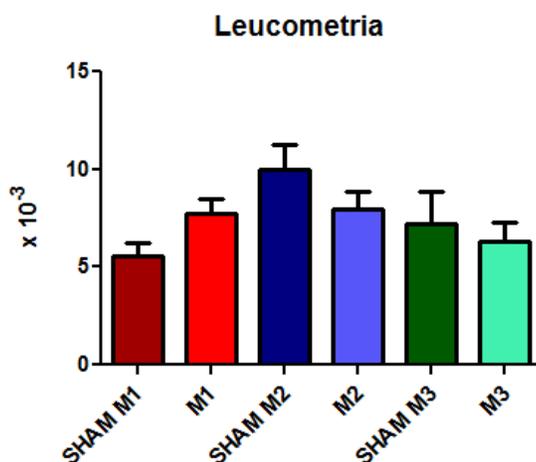
**Figura 12.** Gráfico demonstrando a leucometria dos ratos induzidos ao modelo experimental de sepse por ligadura e punção do ceco nos três momentos avaliados (p<0,05).

Todos os animais estiveram dentro dos parâmetros esperados para a espécie quanto à frequência respiratória (70 a 115 movimentos respiratórios por minuto) e frequência cardíaca (250 a 450 batimentos por minuto). Não houve diferença estatística entre valores encontrados destes parâmetros nos momentos avaliados (Figura 13).



**Figura 13.** Gráficos demonstrando a frequência respiratória e cardíaca dos ratos induzidos ao modelo experimental de sepse por ligadura e punção do ceco nos três momentos avaliados (p<0,05)..

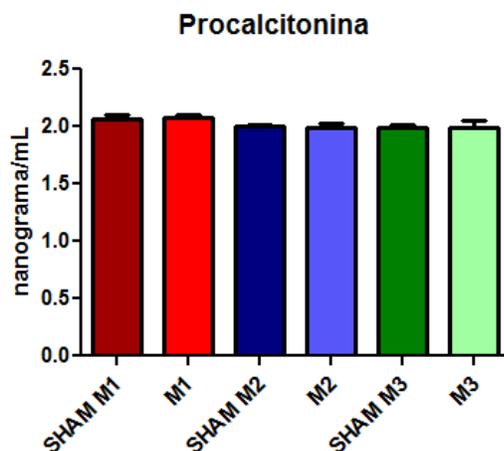
Na segunda etapa, o resultado da leucometria dos animais não apresentou diferença estatística (Figura 14).



**Figura 14.** Gráfico demonstrando os valores da leucometria dos ratos induzidos ao modelo experimental de sepse por ligadura e punção do ceco nos três momentos avaliados e cada momento avaliado comparado com o SHAM ( $p < 0,05$ ).

Após o processo de quantificação do kit de procalcitonina, a equação de regressão linear encontrada foi ' $y = 0,4983x - 0,3674$ ;  $r^2 = 0,8766$ ' e os valores encontrados nas amostras substituídos em 'x'.

Não houve diferença estatística dos valores de procalcitonina encontrados entre os momentos avaliados (Figura 15). Também não houve diferença estatística quando se comparou cada momento com o seu respectivo SHAM.

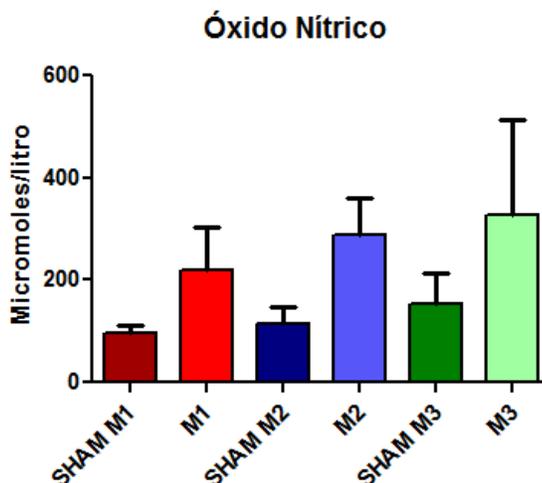


**Figura 15.** Gráfico demonstrando os valores da procalcitonina dos ratos induzidos ao modelo experimental de sepse por ligadura e punção do ceco nos três momentos avaliados e cada momento avaliado comparado com o SHAM ( $p < 0,05$ ).

Após o processo de quantificação do kit de óxido nítrico, a equação de regressão linear de nitrito encontrada foi ' $y = 0,4983x - 0,3674$ ;  $r^2 = 0,9981$ ' e a de

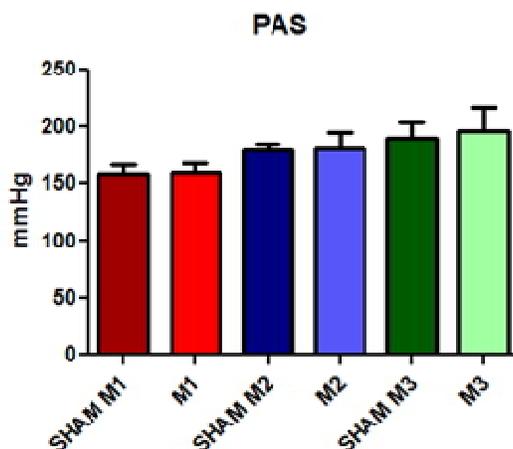
nitrito foi  $y = 0,0066x + 0,0964$ ;  $r^2 = 0,9131$ '. Os valores encontrados nas amostras foram substituídos em 'x' e estes foram somados a fim de estipular o valor final do óxido nítrico.

Não houve diferença estatística no valor de óxido nítrico entre os momentos avaliados e entre cada momento com seu respectivo SHAM (Figura 16).

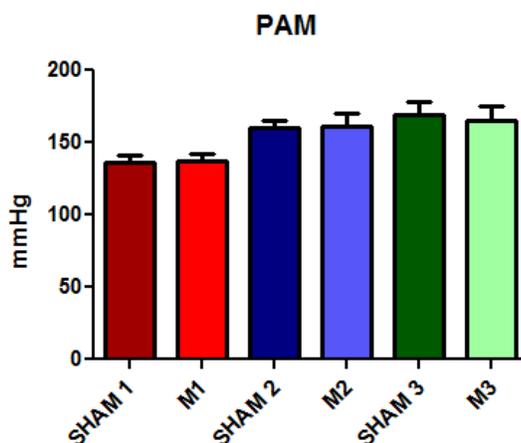


**Figura 16.** Gráfico demonstrando a evolução do óxido nítrico do SHAM e dos ratos induzidos ao modelo experimental de sepse por ligadura e punção do ceco nos três momentos avaliados ( $p < 0,05$ ).

Quando se avaliou a pressão arterial sistólica e média, todos os animais obtiveram valores maiores que os citados na literatura por Carvalho e colaboradores (2009), os quais citam a PAS de ratos de 119,5 mmHg e a PAM, 100 mmHg. Não houve diferença estatística entre o SHAM e os animais induzidos ao modelo experimental de sepse (Figura 17, 18).

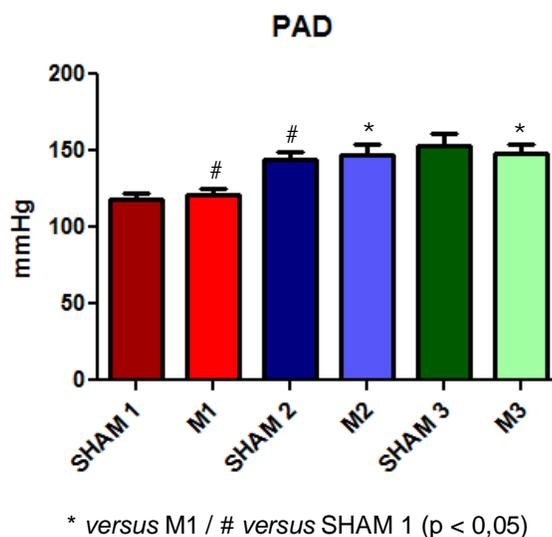


**Figura 17.** Gráfico demonstrando a evolução da pressão arterial sistólica do SHAM e dos ratos induzidos ao modelo experimental por ligadura e punção do ceco de sepse nos três momentos avaliados.



**Figura 18.** Gráfico demonstrando a evolução da pressão arterial média do SHAM e dos animais induzidos ao modelo experimental de sepse nos três momentos avaliados ( $p < 0,05$ ).

Porém, quando se comparou os animais induzidos à sepse experimental, houve diferença estatística na pressão arterial diastólica, observando um aumento da PAD entre o SHAM 1 e SHAM 2, M1 e M2, e M1 e M3 (Figura 19). Além disso, os valores de PAD também estiveram maiores que o citado pela literatura de 81,5 mmHg (Carvalho et al., 2009).



**Figura 19.** Gráfico demonstrando a evolução da pressão arterial diastólica do SHAM e dos ratos induzidos ao modelo experimental de sepse por ligadura e punção do ceco nos três momentos avaliados (p<0,05).

## 8. DISCUSSÃO

Na primeira etapa do experimento, quando se avaliou a leucometria, observou-se leucocitose, seguida de redução dos leucócitos, que é uma característica clássica da sepse, observando-se uma leucocitose por aumento da produção de leucócitos a fim de combater a infecção, seguida de leucopenia pela quimiotaxia destas células pelo foco infeccioso.

Quanto à frequência respiratória e cardíaca, não houve diferença entre os momentos avaliados, porém, clinicamente, observou-se aumento da frequência respiratória no M2, com relação ao M1 e aumento da frequência cardíaca no M3, com relação ao M1, demonstrando, juntamente com os resultados da leucometria, a evolução da sepse descrita por Henkin (2009) que descreve os sintomas da SIRS, com a presença de foco infeccioso como sepse.

Na segunda etapa, apesar de não apresentar diferença estatística, houve um aumento na contagem leucocitária em M2 e a diminuição desta em M3.

Quando se avaliou a procalcitonina, não observamos diferença estatística quando se comparou os momentos; e os valores também não diferiram dos seus

respectivos SHAM. Neste caso, os animais não foram considerados em sepse, visto que os valores encontrados estão abaixo ou muito próximos de 2ng/ml. No entanto, em todos os momentos, os animais estão em SIRS, segundo Arkader (2003) e Liu e colaboradores (2013), que definem valores entre 0,05 e 2ng/ml de procalcitonina como indicativos da mesma.

Os animais SHAM, que sofreram apenas manipulação do ceco, sem ligadura e perfuração do mesmo, também apresentavam valores correspondentes à SIRS. Como estes animais também sofreram o procedimento, para implantação da cânula de pressão arterial, é possível que esses valores aumentados sejam resultado da manipulação cirúrgica, como descrito por Diaz (2008) e Soreng et al. (2011) que afirmam que cirurgias, trauma severo e queimaduras também são capazes de incrementar a PCT.

Como os animais foram avaliados apenas por 4 horas, é possível que os valores de procalcitonina ainda não estivessem no seu pico plasmático, já que, segundo Liu et al. (2013), a PCT em humanos aumenta em 3 horas, tendo seu pico em torno de 6 a 12 horas. O tempo estipulado para avaliação em ratos foi de 4 horas, uma vez que essa espécie tem uma taxa metabólica superior a dos humanos, acreditando-se que esse tempo seria suficiente para a determinação da sepse.

A avaliação do óxido nítrico não demonstrou resultados estatisticamente significativos, mas é possível observar seu aumento tanto nos animais SHAM, quanto nos induzidos, sendo os valores deste último ainda maiores. Isso demonstra que talvez manipulação cirúrgica seja capaz de aumentar os níveis de óxido nítrico plasmático e que o modelo de indução de sepse foi capaz de elevar tais níveis, quando comparado com o SHAM nos três momentos avaliados. Não existem na literatura valores de referência de óxido nítrico plasmático, portanto a avaliação foi feita comparando os valores entre os momentos estudados, sendo cada animal controle dele mesmo. O aumento de óxido nítrico comprova o que foi descrito por Vieira (2007) que afirmou que os níveis de óxido nítrico aumentam pela produção de iNOS quando há um envolvimento inflamatório resultante de uma infecção ou dano tecidual.

Quando a pressão arterial invasiva foi avaliada, era esperado observar hipotensão, visto que a literatura cita que o paciente em choque séptico apresenta hipotensão refratária a reposição volêmica. Além disso, autores também afirmam

que o óxido nítrico promove vasodilatação, o que deveria acarretar uma queda na pressão arterial também. (PEREIRA et al., 2014).

Neste trabalho, não observamos diferença estatística entre as pressões sistólica e média, porém foi observada uma tendência à hipertensão no momento 2, provavelmente devido à avaliação do momento 1 ter sido realizada logo após o procedimento cirúrgico e os animais ainda estarem em retorno anestésico.

A manutenção da pressão arterial média estável, durante toda a avaliação, mostra que, apesar do óxido nítrico estar relacionado com a vasodilatação nos pacientes em choque séptico, seu aumento na circulação não interferiu nos valores da pressão arterial média, podendo-se deduzir que seu aumento antecede à hipotensão clínica nos pacientes. Pereira e colaboradores (2014) acompanharam pacientes diagnosticados com sepse, sepse grave e choque séptico e não observaram diferença estatística entre os valores de óxido nítrico nas diferentes fases da sepse. Porém, aqueles que estavam em choque séptico tiveram um aumento significativo nos níveis de nitrato plasmático. Esses mesmos autores também não observaram relação entre a hipotensão arterial média e o aumento do óxido nítrico nos cães em sepse, sepse grave ou choque séptico.

A pressão arterial diastólica sofreu um aumento entre SHAM 1 e SHAM 2, M1 e M2, e M1 e M3. Segundo Hajjar e colaboradores (2004), a disfunção diastólica induzida pela sepse ainda não está bem estabelecida, mas pode ocorrer isolada ou associada à disfunção sistólica. O aumento da pressão diastólica, observado neste trabalho, pode ter ocorrido devido à restrição imposta pelo pericárdio, que tende a promover um rápido enchimento ventricular, como citado por Lavine et al. (1986). Além disso, Bouhemad e colaboradores (2008) avaliaram o coração de pacientes em choque séptico através de ecocardiografia com Doppler e observaram relaxamento reduzido do ventrículo esquerdo como fator isolado em 20% dos 54 pacientes com choque séptico.

O enchimento ventricular mais acelerado e a redução do relaxamento ventricular esquerdo podem ter sido fatores determinantes para o aumento da pressão arterial diastólica observada. Como não foi realizada avaliação cardíaca neste caso, como mensuração dos níveis de troponina e ecocardiografia, não é possível afirmar que este achado seja justificado pelas alterações supracitadas.

Munt e colaboradores (1998) observaram ainda que as alterações diastólicas mais acentuadas foram observadas no grupo de pacientes sépticos não sobreviventes.

## **9. CONCLUSÃO**

Após o término do experimento e análise dos resultados, podemos obter as seguintes conclusões:

- O modelo de ligadura e punção do ceco foi eficaz para indução da sepse aguda em ratos Wistar, porém os animais não evoluíram para sepse grave no tempo estudado.
- Os níveis de procalcitonina estiveram altos desde o início da avaliação, indicando que o processo cirúrgico de implantação da cânula e laparotomia estiveram envolvidos.
- Os níveis de óxido nítrico aumentaram, mesmo que não significativo estatisticamente, mas não foram capazes de causar hipotensão.
- A pressão arterial como único método de avaliação não foi um bom preditor do início da sepse durante as quatro horas estudadas, já que não foi possível estabelecer correlação entre seus valores e os biomarcadores estudados.

## **10. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Algumas dificuldades encontradas, durante a realização do experimento, devem ser citadas a fim de permitir futuros estudos com relação à implantação da cânula e avaliação dos animais submetidos a sepse.

Apesar do cuidado em fixar a cânula atrás do pescoço, alguns animais ainda conseguiram mexer na mesma, algumas vezes retirando a cânula da carótida, levando-os à morte. Este ponto é importante para frisar a necessidade de uma boa fixação tanto na região que a cânula é implantada quanto na pele.

Nos animais utilizados no piloto, foi possível observar a quantidade de sangue necessária para extrair o plasma utilizado nas mensurações dos leucócitos, procalcitonina e óxido nítrico. O volume mínimo de sangue que supria a necessidade

de plasma foi de 1 mL, o que é um volume alto para ratos de 300 gramas. Esse ponto foi solucionado administrando, o mesmo volume de solução salina a 0,9%, o que evitaria mascarar os resultados por causar hipotensão secundária à hipovolemia. Contudo, ainda não se sabe se a administração deste volume de solução fisiológica pode diluir os marcadores avaliados, mascarando também os resultados finais.

Ao final do experimento, foi discutido se o omento poderia migrar para o local de injúria provocado no ceco devido à tendência à migração descrita, por exemplo, do omento em direção ao corpo do útero de cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia. Se isso acontecer de fato, no ceco perfurado, é possível que o volume de fezes extravasado na cavidade abdominal possa ser prejudicado, já que o omento funcionaria como um tampão nesta região.

A avaliação acabou restringida a quatro horas, pois, nesta última avaliação, os animais já se encontravam muito debilitados e, outros animais, descartados do estudo, vieram a óbito por volta desse tempo. Ainda não se sabe o que levou os animais ao óbito, mas especulamos que talvez, apesar de realizada a reposição volêmica, os animais pudessem estar submetidos à anemia grave pelo volume final de sangue retirado após as avaliações.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, C.; BRUN-BUISSON, C.; BURCHARDI, H. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicenter cohort study. **Intensive Care Medicine**, v. 28, p. 108-121, 2002.

ANDALUZ-OJEDA, D.; BOBILLO, F.; IGLESIAS, V.; ALMANSA, R.; RICO, L.; GANDÍA, F.; RESINO, S.; TAMAYO, E.; LEJARAZU, R. O.; BERMEJO-MARTIN, J. F. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. **Cytokine**, v. 57, p. 332-336, 2012.

ANDRIOLO, A.; COSTA, R. P.; NOVO, N. F. Pró-calcitonina e proteína C reativa em processos infecciosos graves. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 169-174, 2004.

ARAÚJO, J. F. **Escores clínicos e biomarcadores da resposta inflamatória aguda em pacientes com sepse**. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe, 2011. 59p.

ARKADER, R. **Avaliação da procalcitonina como marcador de sepse e de choque séptico em pacientes pediátricos**. São Paulo: USP, 2003. 64p.

AZEVEDO, J. R. A.; TORRES, O. J. M.; CZECZKO, N. G.; TUON, F. F.; NASSIF, P. A. N. SOUZA, G. D. Procalcitonina como biomarcador de prognóstico da sepse grave e choque séptico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, p. 456-461, 2012.

BARBOSA, A. P.; PINHEIRO, C.; RIGATO, O.; LOBO, S.; FRIEDMAN, G. Critérios para diagnóstico e monitorização da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 16, p. 105-108, 2004.

BENJAMIN, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Simpósio: Medicina Intensiva – 3ª parte**, v. 34, p. 18-26, 2001.

BOCHUD, P. Y.; GLAUSER, M. P.; CALANDRA, T. Antibiotics in sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 27, p. 33-48, 2001.

BOUHEMAD, B.; NICOLAS-ROBIN, A.; ARBELOT, C.; ARTHAUD, M.; FÉGER, F.; ROUBY, J. J. Isolated and reversible impairment of ventricular relaxation in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 36, p. 766-774, 2008.

CARVALHO, G. D.; MASSENO, A. P. B.; ZANINI, M. S.; ZANINI, S. F.; PORFÍRIO, L. C.; MACHADO, J. P.; MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, v. 56, p. 51-57, 2009.

CARVALHO, P. R. A.; TROTTA, E. A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. **Jornal de Pediatria**, v. 79 (Supl.2), p. S195-S204, 2003.

CASTELLO BRANCO, A. C. S.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. M.; RAMALHO, J. A.; DANTAS, J. G. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, p. 205-214, 2011.

CECCON, M. E. J. R.; VAZ, F. A. C. Os mediadores inflamatórios no diagnóstico da sepse no recém-nascido. **Pediatria**, v. 26, p. 110-119, 2004.

DIAZ, M. M. O. **Procalcitonina como biomarcador diagnóstico nas doenças infecciosas**. Brasília: Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília, 2008. 48p.

DOI, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P. S. T.; STAR, R. A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 2868-2878, 2009.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265-271, 2000.

FIORETTO, J. R.; BORIN, F. C.; BONATTO, R. C.; RICCHETTI, S. M. Q.; KUROKAWA, C. S.; MORAES, M. A.; CARPI, M. F.; PADOVANI, C. R.; MARTIN, J. G. Procalcitonin in children with sepsis and septic shock. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 323-328, 2007.

HAJJAR, L. A.; JÚNIOR, C. J. F.; MERCON, E. S.; GÓIS, A. F. T.; KNOBEL, L.; LAGE, S. G. Disfunção miocárdica na sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 16, p. 185-191, 2004.

HAUSER, B.; BRACHT, H.; MATEJOVIC, M. RADERMACHER, P.; VENKATESH, B. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. **Anesthesia and Analgesia**, v. 101, p. 488-498, 2005.

HENKIN, C. S.; COELHO, J. C.; PAGANELLA, M. C.; SIQUEIRA, R. M.; DIAS, F. S. Sepse: uma visão atual. **Scientia Medica**, v. 19, p. 135-145, 2009.

ISHIKAWA, K.; CALZAVACCA, P.; BELLOMO, R.; BAILEY, M.; MAY, C. N. Effect of selective inhibition of renal inducible nitric oxide synthase on renal blood flow and function in experimental hyperdynamic sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 40, p. 2368-2375, 2012.

JIN, M.; KHAN, A. I. Procalcitonin: uses the clinical laboratory for the diagnosis of sepsis. **LabMedicine**, v. 41, p. 173-177, 2009.

KENT, N.; FIELDS, W. Early recognition of sepsis in the emergency department: an evidence-based project. **Journal of Emergency Nursing**, v. 38, p. 139-143, 2012.

KIBE, S.; ADAMS, K.; BARLOW, G. Diagnostic and prognostic biomarkers in critical care. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 33-40, 2011.

KNOBEL, E. Óxido nítrico e sepse. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 67, p. 263-266, 1996.

KNÖBL, P. Pathophysiology and therapy of sepsis-associated coagulation disorders. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 152, p. 559-563, 2002.

LAVINE, S. J.; CAMPBELL, C. A.; GUNTHER, S. J. Effect of increased left ventricular size and filling pressure on diastolic filling. [Abstract]. **Circulation**, p. 7-11, 1986.

LIU, Y. J.; DU, P.; RAO, J. Procalcitonin as a diagnostic and prognostic marker for sepsis caused by intestinal infection: a case report. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, p. 1311-1313, 2013.

LVOVSCHI, V.; ARNAUD, L.; PARIZOT, C.; FREUND, Y.; JUILLIEN, G.; GHILLANI-DALBIN, P.; BOUBERINA, M.; LARSEN, M.; RIOU, B.; GOROCHOV, G.; HAUSFATER, P. Cytokine profiles in sepsis have limited relevance for stratifying patients in the emergency department: a prospective observational study. **PLoS One**, v. 6, p. 1-13, 2011.

MOSCOVITZ, H.; SHOFER, F.; MIGNOTT, H.; BEHRMAN, A.; KILPATRICK, L. Plasma cytokine determination in emergency department patients as a predictor of bacteremia and infectious disease severity. **Critical Care Medicine**, v. 22, p. 1102-1107, 1994.

MUNT, B.; JUE, J.; GIN, K.; TWEEDDALE, M. Diastolic filling in human severe sepsis: an echocardiographic study. **Critical Care Medicine**, v. 26, p. 1829-1833, 1998.

NIELSEN, L.; TOFT, N.; ECKERSALL, P. D.; MELLOR, D. J.; MORRIS, J. S. Serum C-reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 1231-1236, 2007.

PALMIERE, C.; BARDY, D.; MANGIN, P.; AUGSBURGER, M. Value of sTREM-1, procalcitonin and CRP as laboratory parameters for postmortem diagnosis of sepsis. **British Infection Association**, p. 1-11, 2013.

PATIL, V. K.; MORJARIA, J. B.; VILLERS, F.; BABU, S. K. Associations between procalcitonin and markers of bacterial sepsis. **Medicina (Kaunas)**, v. 48, p. 383-387, 2012.

PEREIRA, F. H.; BATALHÃO, M. E.; CÁRNIO, E. C. Correlação entre temperatura corporal, pressão arterial e concentração plasmática de óxido nítrico em pacientes com sepse. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 22, p.1-6, 2014.

PORTELLA, V. G. **Desenvolvimento da insuficiência renal promovida pela sepse induzida pelo modelo CLP (Cecal Ligation and Puncture): avaliação morfológica e de parâmetros renais e inflamatórios**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

PUREZA, D. Y. **Modulação autonômica cardíaca em repouso e durante o exercício em ratos diabéticos: avaliações hemodinâmicas e morfométricas de gânglios parassimpáticos cardíacos**. São Paulo: Universidade de São Judas Tadeu, 2006.

SANKAR, V.; WEBSTER, N. R. Clinical application of sepsis biomarkers. **Journal of Anesthesia**, p. 1-15, 2012.

SANTOS, W. B.; MESQUITA, E. T.; VIEIRA, R. M. R.; OLEJ, B.; COUTINHO, M.; AVEZUM, A. Proteína C reativa e doença cardiovascular: as bases da evidência científica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 80, p. 452-456, 2003.

SENER, G.; OZGUR, E.; RAD, A. Y. UZUN, L.; SAY, R.; DENIZLI, A. Rapid real-time detection of procalcitonin using a microcontact imprinted surface plasmon resonance biosensor. **Analyst**, v.189, p. 6422-6428, 2013.

SHIRAMIZO, S. C. P. L.; MARRA, A. M.; DURÃO, M. S.; PAES, A. T.; EDMOND, M. B.; SANTOS, O. F. P. Decreasing mortality in severe sepsis and septic shock patients by implementing a sepsis bundle in a hospital setting. **PLoS One**, v.6, p. 1-6, 2011.

SORENG, K.; LEVY, R. Procalcitonin: an emerging biomarker of bacterial sepsis. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 33, p. 171-178, 2011.

TRAMONTE, R.; CARVALHO, R. O. M.; FARIAS, D. C.; SERAFIM, J. D. M.; ORTELLADO, D. K.; d'ACAMPORA. Alterações da mucosa intestinal em ratos: estudo morfométrico de três diferentes tratamentos após indução experimental de sepse abdominal aguda. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, p. 120-125, 2004.

VANZANT, A. M.; SCHMELZER, M. Detecting and treating sepsis in the emergency department. **Journal of Emergency Nursing**, v. 37, p. 47-54, 2011.

VIEIRA, P. M. A. O. **Participação do óxido nítrico na infecção experimental de cães pelo *Trypanossoma cruzi***. Minas Gerais: Universidade Federal de Ouro Preto, 2007. 87p.

WATTEL, F.; MATHIEU, D.; NEVIÈRE, R.; BOCQUILLON, N. Role of microcirculation in multiorgan failure of infectious origin. **Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine**, v. 184, p.1609-19, 2000.