

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**GUILHERME DE SOUZA VIERA**

**AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA E DA ACIDOSE METABÓLICA DURANTE A  
SÍNDROME SEPSE EM RATOS WISTAR**

Campos dos Goytacazes

2021

**GUILHERME DE SOUZA VIEIRA**

**AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA E DA ACIDOSE METABÓLICA DURANTE A  
SÍNDROME SEPSE EM RATOS WISTAR**

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

**ORIENTADOR: Professor André Lacerda de Abreu Oliveira**  
Campos dos Goytacazes

2021

**GUILHERME DE SOUZA VIEIRA**

**AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA E DA ACIDOSE METABÓLICA DURANTE A  
SÍNDROME SEPSE EM RATOS WISTAR**

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

Aprovado em 30/09/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Antônio Albernaz Peixoto - UENF

---

Prof. Dr. Renato Mouran Ramos – UNIG

---

Orientador - Prof. Dr. André Lacerda de Abreu Oliveira - UENF

## AGRADECIMENTOS

Há tanto para agradecer...

À Deus, que me permitiu a vida e chegar aqui hoje. Não posso chamar de missão, mas de presente.

Aos meus pais, Elias e Pedrina, início de tudo. Onde aprendi o valor do estudo e do trabalho honesto. Onde tive apoio sempre que necessário e orações que me mantiveram de pé.

À minha esposa Gabriella, que sempre foi minha força e meu coração. Nada foi, é ou será possível sem seu apoio, sua serenidade e seu companheirismo. À sorte de ter a pessoa mais generosa ao meu lado.

Ao meu filho Bernardo e grande amor que nasceu durante essa jornada, uma dádiva de Deus, maior estímulo em minha vida.

Ao meu irmão Gustavo, carinho em forma pessoa, ombro querido e tradução mais forte da palavra irmão.

Ao meu orientador André Lacerda, um amigo que me aceitou nesse projeto e me apoiou em tudo que precisei, importante por hoje estar apto para defender essa tese.

À professora, coorientadora e amiga Fernanda Antunes. Sorriso fácil e sempre disponível para tudo. Incentivadora nessa nova fase de minha vida, que muito me ensinou e tenho certeza que levarei sempre comigo além de uma excelente professora, uma grande amiga

À todos os companheiros de pós-graduação, especialmente Isabella, Josias, Flávio, Guilherme Monteiro, Luciana, Scarlath, Ivaney, Jussara, Rodney e todos os que fizeram desses anos os mais felizes que uma pós-graduação pode ser.

À todos que cruzaram meu caminho, fazendo parte de um jeito ou de outro do que me tornei hoje. Sei que cheguei aqui diferente do que sou hoje e espero que tenha me tornado alguém melhor, porque feliz é esta jornada.

Aos membros da banca, Prof Antônio Albernaz, e Prof. Renato Moran pela disponibilidade de estarem presentes neste dia e por toda ajuda durante essa jornada acadêmica.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, que me propiciou engrandecimento acadêmico e apoio financeiro.

## RESUMO

Sepse é uma condição clínica grave caracterizada por intensa resposta inflamatória sistêmica causada pela interação entre antígenos microbianos e componentes do sistema imune inato. A ativação de vias da inflamação e da coagulação são os maiores determinantes da falência circulatória e disfunção de múltiplos órgãos constatada na sepse. Diversos estudos têm demonstrado a associação entre a acidose metabólica e a sepse. Apesar do grande número de publicações relacionadas à sepse, o conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos e os principais mediadores sistêmicos ativados ainda não estão esclarecidos. Sabe-se que ocorrem oscilações hemodinâmicas, como hipotensão e redução do fluxo sanguíneo renal, que induzem a isquemia renal e a hipóxia tecidual incorrendo em declínio da taxa de filtração glomerular. Este trabalho objetivou induzir a sepse de maneira experimental em ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), através do modelo de ligação e punção cecal. Foram avaliados os aspectos hemodinâmicos como pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca; os quais apresentaram quadro de hipotensão; aspectos hematológicos como contagem de leucócitos e plaquetas, os quais apresentaram leucocitose e plaquetopenia; análise de ação do óxido nítrico; e análise de bioquímica sérica através da avaliação de uréia e creatinina séricas, as quais apresentaram aumento considerável e também análise hemogasométrica. Os animais permaneceram em sepse por um período de 2 horas, depois, os rins foram enviados para avaliação histopatológica em que se evidenciou que um período de 2 horas não é tempo suficiente para uma lesão grave no órgão, sendo assim a sepse se apresentou como causadora de uma disfunção renal e não de uma lesão renal; as estruturas estavam normais apresentando apenas degeneração hidrópica, perda protéica e alguns apresentaram necrose. Esse trabalho concluiu que o modelo experimental de sepse de ligação e punção do ceco é eficiente e é o que melhor retrata as características clínicas mais comuns da sepse.

**Palavras-chave: sepse, hemogasometria, ratos Wistar, CLP.**

## ABSTRACT

Sepsis is a serious clinical condition characterized by intense systemic inflammatory response which is caused by the interaction between microbial antigens and the components of the innate immune system. The activation of inflammation and coagulation pathways are determinants for the circulatory failure and multiple organ dysfunction observed in sepsis. Several studies have demonstrated the association between acute metabolic acidosis and sepsis. Despite the large number of publications related to sepsis, the knowledge about the pathophysiological mechanisms involved and the main systemic mediators activated are still unclear. Hemodynamic oscillations are known to occur, such as hypotension and reduced renal blood flow, which induce renal ischemia and tissue hypoxia resulting in a decline in the glomerular filtration rate. This work aimed to induce sepsis in experimentally male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), through the model of cecal ligation and puncture. Hemodynamic aspects such as systolic and diastolic pressure and heart rate were evaluated; which presented hypotension; hematological aspects such as leukocyte and platelet counts, which presented leukocytosis and thrombocytopenia; nitric oxide action analysis; and analysis of serum biochemistry through the evaluation of serum urea and creatinine, which showed a considerable increase and also blood gas analysis. The animals remained in sepsis for a period of 2 hours, after which the kidneys were sent for histopathological evaluation in and it was evidenced that a period of 2 hours is not enough time for a seriously lesion the organ, so sepsis presented itself as causative of a renal dysfunction and not of a renal injury; the structures were normal presenting only hydropic degeneration, protein loss and some presented necrosis. This study concluded that the experimental model of cecum ligation and puncture sepsis is efficient and is the one that most accurately portrays the most common clinical features of sepsis.

Key words: sepsis, blood gas analysis, Wistar rats, cecum ligation puncture

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>10</b>
2.1. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE .....	10
2.2. ÓXIDO NÍTRICO .....	14
2.3. HEMOGASOMETRIA.....	15
2.4. HOMEOSTASE ÁCIDO-BASE .....	18
2.5. ACIDOSE METABÓLICA .....	19
2.5. INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA SEPSE .....	23
2.6. DIAGNÓSTICO .....	24
<b>3. OBJETIVOS GERAIS</b> .....	<b>26</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
5.1. INDUÇÃO DA SÍNDROME SEPSE.....	27
5.2. ANÁLISE LABORATORIAL .....	33
5.4. HISTOPATOLOGIA.....	35
5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O termo septicemia foi utilizado por muito tempo para definir a presença destas complicações, mas, desde o início da década de 1990, este termo foi gradativamente abandonado pela comunidade médica, por se referir apenas à proliferação do agente infeccioso na circulação sanguínea, o que não explicaria as manifestações sistêmicas da síndrome (SALOMÃO *et al.*, 2019). Em 1991, a comunidade médica, especialmente especialistas dos Estados Unidos e da Europa, se reuniram para a criação do primeiro consenso de definição da sepse. Segundo este consenso, a sepse seria uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) causada por um agente infeccioso de qualquer origem (bactérias, fungos, vírus, protozoários etc.). Este conceito foi endossado durante a elaboração do segundo consenso de definição da sepse, realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores em 2003 (RELLO *et al.*, 2017).

A síndrome sepse representa a maior causa de mortalidade conhecida no mundo, até os dias de hoje. Esta síndrome causa anormalidades fisiológicas, patológicas e bioquímicas, podendo ser causadas por uma infecção ou outro tipo de injúria severa, como o trauma, por exemplo. Somente no ano de 2011, a sepse causou um prejuízo de mais de 20 bilhões de dólares em custos hospitalares. Atualmente, 8 em cada 10 pessoas desenvolvem sepse em ambientes fora do ambiente hospitalar, onerando ainda mais o tratamento (MACHADO *et al.*, 2017). Além disso, dentre os sobreviventes da sepse, ainda há um número considerável de doentes que necessitam de acompanhamento psicológico, físico e cognitivo durante substancial período, ajudando a elevar os custos consideravelmente (SINGER *et al.*, 2016).

Há mais de cem anos atrás, um renomado médico e professor chamado Willian Osler observou em seus artigos que “o paciente mais parece morrer da resposta do corpo à infecção do que da própria infecção em si”. Com o avanço dos estudos na área imunocelular, houve o entendimento (ainda não totalmente



esclarecido) dos mecanismos que formam a patogênese da sepse. Estes mecanismos são complexos e envolvem vários aspectos da interação entre os agentes infectantes e os hospedeiros. A ativação celular resultante do reconhecimento dos patógenos é fundamental para o controle da infecção, mas, paradoxalmente, a resposta inflamatória do hospedeiro também é o substrato para as mudanças fisiopatológicas na sepse (VAN der POLL *et al.*, 2017).

Com os avanços nas pesquisas sobre o tema e, conseqüentemente, um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos que envolvem a sepse, percebeu-se a necessidade de um novo conceito sobre esta síndrome, uma vez que ficou mais evidente que as respostas inflamatórias são desencadeadas no início do processo infeccioso e que estes mecanismos interferiam diretamente nos processos de disfunção celular e orgânica e as estratégias de combate à sepse eram focadas na terapia contra a resposta inflamatória, o que poderia se traduzir em muito tempo gasto com pouca efetividade no tratamento (SALOMÃO *et al.*, 2019).

Em 2014, a Sociedade Europeia de Medicina Intensiva e a Sociedade de Medicina Intensiva e Cuidados Críticos reuniram uma força-tarefa de 19 especialistas nas áreas de terapia intensiva, doenças infecciosas, cirurgia e pneumologia com objetivo de elaborar um novo consenso, com independência financeira e, a partir destes, a avaliação dos estudos pertinentes em epidemiologia da sepse, bem como os ensaios clínicos sobre o tema, pesquisa básica ou translacional (SINGER *et al.*, 2016)

Em 2016, foi então publicado o terceiro consenso de definição da sepse e, desde então, esta síndrome é definida como a presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida, através de uma resposta inflamatória desregulada do organismo hospedeiro à uma infecção ou mesmo ao trauma. Para uma melhor definição da síndrome sepse, é importante a inclusão correta e precoce dos pacientes nos protocolos iniciais de tratamento, pois a evolução da síndrome pode ser rápida e fatal para muitos acometidos por ela (RELLO *et al.*, 2017).

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou um documento onde chama a atenção para a gravidade da sepse, que chega a matar mais de 6 milhões de pessoas por ano no mundo, e os altos custos

hospitalares relacionados a ela. Desta forma, a entidade passou a considerar a sepse como uma das prioridades da saúde mundial e convocou os Estados membros a desenvolverem políticas de saúde pública voltadas à prevenção, ao reconhecimento e ao tratamento da sepse (AZEVEDO *et al.*, 2018)

O conhecimento, ainda que incompleto, do envolvimento dos mediadores inflamatórios liberados na resposta do hospedeiro ao agente infeccioso, como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) causando ativação da coagulação, vasodilatação, extravasamento endotelial e mobilização de neutrófilos para o espaço extra vascular, faz com que a cada dia apareçam novas linhas de pesquisa sobre o assunto, especialmente envolvendo a relação entre estes mediadores inflamatórios e as disfunções orgânicas associadas à sepse (MARSHALL *et al.*, 2003; ANGUS *et al.*, 2013).

A gasometria é uma ferramenta de diagnóstico comumente usada para avaliar as pressões parciais dos gases no sangue e o conteúdo ácido-básico. A compreensão e o uso da análise de gases sanguíneos permitem que os provedores interpretem distúrbios respiratórios, circulatórios e metabólicos (GATTIONI; PESENTI; MATTHAY, 2018).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE**

Tradicionalmente a sepse pode ser entendida como uma SIRS desencadeada por uma infecção (BONE, 1997), um estado patológico com potencial letalidade decorrente da resposta sistêmica do organismo associada à disfunção orgânica (VINCENT, *et al.*, 2013). Esta resposta recebe o nome de SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica), que ocorre não apenas em resposta a infecções, mas também a outros insultos como traumas e queimaduras. Recentemente uma nova definição de sepse foi proposta, e consiste na presença de disfunções orgânicas resultantes de uma resposta desregulada à infecção. O objetivo deste ajuste foi principalmente deixar claro que a sepse está presente apenas quando a resposta à infecção está associada a aumento do risco de morte (SINGER, *et al.*, 2016). A sepse grave apresenta

taxas de mortalidade de até 30% em países desenvolvidos (GAIESKI, et al., 2013), esse índice foi associado ao uso de agentes imunossupressores e procedimentos invasivos, além do aumento da expectativa de vida da população, elevando a incidência a mais de 10% nos últimos 10 anos (CONDE, et al., 2013). No Brasil, essas taxas de, variam de 32,8% para pacientes com sepse até 72,7% para pacientes com choque séptico (VAN DER POLL; HERWALD, 2014). Estudo recente mostrou que no Brasil, pacientes tratados no serviço público apresentam taxas de mortalidade mais elevadas que pacientes tratados na rede privada (CONDE, et al., 2013). Outro ponto importante é que a despeito dos grandes avanços obtidos na compreensão da fisiopatologia, o tratamento segue baseado no uso de antibióticos e na terapia de suporte. De fato, não há até o momento, terapia direcionada para pontos específicos da resposta inflamatória da sepse.

O paradigma clássico para entendimento da fisiopatologia da sepse está baseado no conceito que a sepse seria uma condição caracterizada pela ativação exacerbada e desregulada destes mecanismos, que de benéficos, passariam a deletérios (SEELEY, et al., 2012). A interação entre hospedeiro e agente infeccioso, o reconhecimento de patógenos e a consequente ativação celular são fundamentais para o controle da infecção, mas, de maneira paradoxal, também contribuem para as mudanças fisiopatológicas (SALOMÃO *et al.*, 2019). Buscando respostas sobre esta interação entre hospedeiros e agentes infecciosos, Freudenberg e colaboradores realizaram experimentos com transferência de macrófagos de camundongos sensíveis aos lipopolissacarídeos (LPS) (C3H/HeN) para camundongos resistentes aos LPS (C3H/HeJ) que passaram ser suscetíveis à atividade letal do LPS (FREUDENBERG *et al.*, 1986). Os LPS e receptores “*Toll like 4*” (TLR4), mediados por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) são capazes de identificar patógenos e produtos comuns das vias de biossíntese dos microrganismos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (JANEWAY *et al.*, 1989).

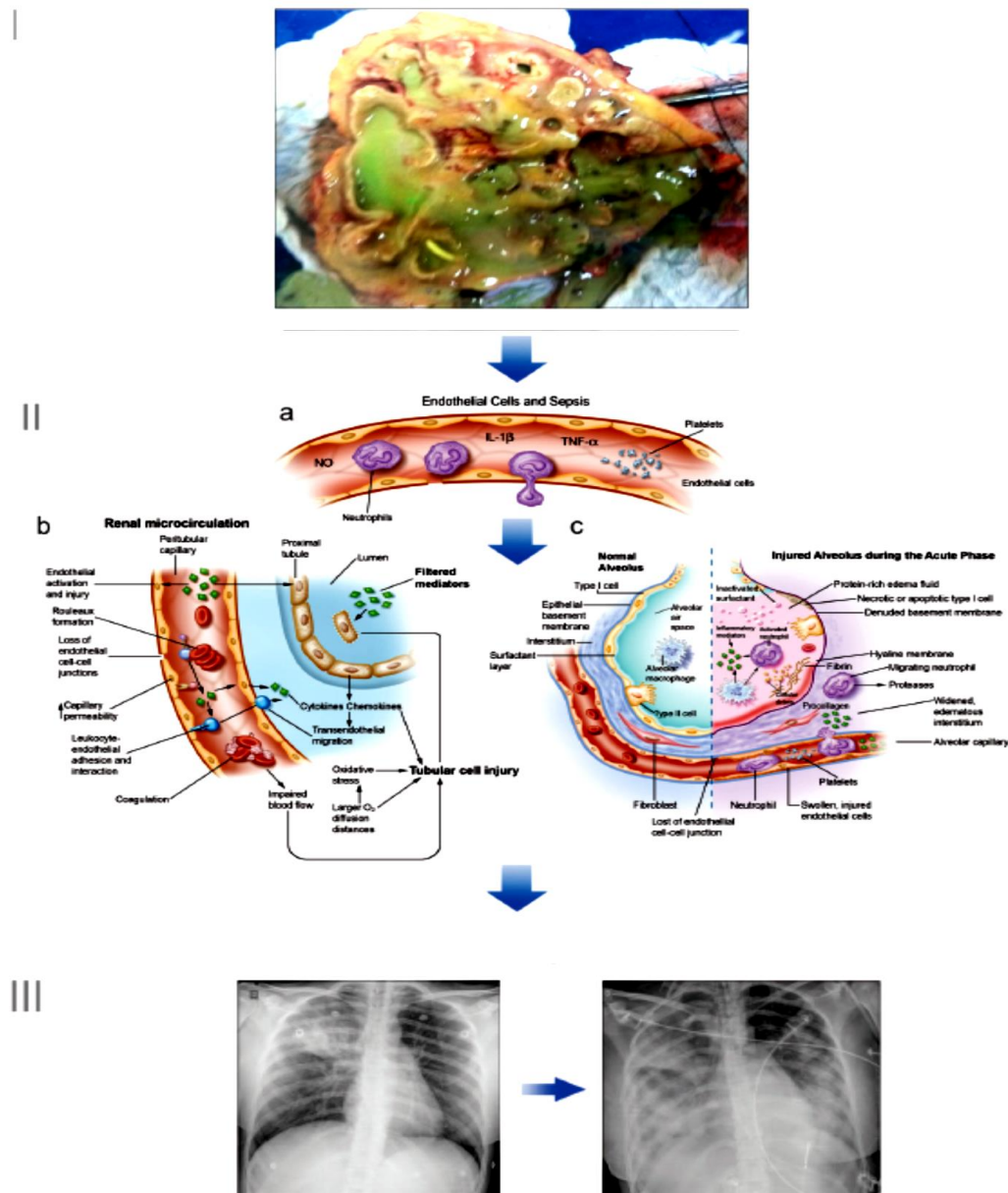
A duração, extensão e a direção dos eventos pró ou anti-inflamatórios variam de acordo com a idade, medicamentos em uso, doenças concomitantes, além da carga microbiana e sua virulência (MARSHALL *et al.*, 2003). Dano tecidual e necrose celular são consequências importantes da resposta orgânica exacerbada, e como resultado há liberação de padrões moleculares associados

à lesão, moléculas de risco, que prolongam o tempo das lesões, e agem sobre os mesmos receptores de reconhecimento padrão sensibilizados pelos agentes infecciosos (ANGUS *et al.*, 2012).

Além de PRRs e PAMPs, estão relacionados a resposta imune inata os TLRs de superfície celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6), responsáveis pelo reconhecimento de lipoproteínas bacterianas como flagelina, ácido lipoteicóico e os TLRs intracelulares (TLR3, TLR7 e TLR9) que reconhecem material genético viral e bacteriano. Moléculas como os NLRs, RLRs e CLRAs participam do reconhecimento de produtos microbianos, resultando em efeitos sinérgicos e antagônicos complementares, participando da modulação da imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (BONE *et al.*, 1997; VAN der POLL *et al.*, 2008). Os PRRs também são capazes de reconhecer substratos hospedeiros conhecidos como “alarmins” ou “sinais de risco” tais como proteínas associadas ao choque térmico e proteínas de alta mobilidade tipo “Box 1” (HMGB1), que possuem relevante participação na regulação da resposta inflamatória (HOTCHKISS *et al.*, 2013).

Em condições usuais, o processo inflamatório desencadeado pela infecção deve ser regulado suavemente e se reconhece que estes mecanismos de controle são afetados no paciente séptico (ANGUS *et al.*, 2013). O termo “síndrome de resposta anti-inflamatória compensatória” (CARS) foi proposto para identificar estes mecanismos de controle: um deles seria uma resposta inflamatória equilibrada, que resultaria no controle da infecção e na recuperação das disfunções orgânicas, enquanto o outro mecanismo seria da predominância da resposta inflamatória, chamada de imunossupressão da sepse, que seria responsável pela manutenção dos focos infecciosos (ou desenvolvimento de novas infecções, oportunistas ou sequenciais), com agravamento das disfunções orgânicas e podendo levar o doente à morte (FIGURA 1)(MARSHALL *et al.*, 2003; BONE *et al.*, 1996; HOTCHKISS *et al.*, 2013).

Desta forma, a sepse ganhou evidência como uma condição imunossupressora, que predispõe os indivíduos afetados a infecções secundárias, normalmente com agentes de baixa patogenicidade (HOTCHKISS *et al.*, 2003).



**FIGURA 1:** Etapas sequenciais da patogênese da sepse e disfunção orgânica. Em I: infecção: pielonefrite em um paciente com choque séptico. Em II: alterações endoteliais induzidas pela sepse, levando à disfunção orgânica; Em II a: alterações endoteliais esquemáticas; Em II b: microcirculação renal: lesão induzida pela sepse no endotélio, microcirculação e células tubulares. Em II c: Alterações alvéolo-capilares durante a fase aguda da lesão pulmonar aguda e síndrome do desconforto respiratório agudo. Em III, disfunção orgânica: achados radiográficos em paciente séptico com lesão pulmonar progressiva e síndrome do desconforto respiratório agudo (SALOMÃO *et al.*, 2019).

## 2.2. ÓXIDO NÍTRICO

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.

Muitas células são capazes de sintetizar o NO através de hemeoproteínas da família citocromo P450-like, chamadas de NO sintases (NOS). As NOS são dependentes de O<sub>2</sub>, NADPH, flavinas e biopterinas para exercer sua atividade (HAUSER et al., 2005).

As NOS são indispensáveis 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). As NOS diferem 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, pois necessitam de Ca<sup>2+</sup> para sua ativação, ou seja, é necessária determinada concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular para existir a atividade enzimática, caso ocorra queda no nível 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, 2007).

A iNOS ou Isoforma II não é expressa sob condições normais, mas é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em várias células como macrófagos, neutrófilos, células de Kupffer e hepatócitos (VIEIRA, 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, 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 auto-ímmunes (VIEIRA, 2007).

A primeira função atribuída ao NO como mediador biológico foi a sua capacidade para produzir vasodilatação, mas 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 na vasodilatação e hipotensão profunda, que leva 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 morte celular (ISHIKAWA et al., 2012).

### **2.3. HEMOGASOMETRIA**

A hemogasometria é considerada o método mais adequado e confiável para detectar alterações no equilíbrio ácido-base dos fluidos corporais. Durante atividade intensa, ocorrem mudanças na diferença entre as pressões alveolar e arterial de oxigênio ( $O_2$ ), essa diferença pode impedir a difusão do  $O_2$  dos alvéolos para o sangue causando hipóxia (KIM *et. al.*, 2015)

De acordo com Rocco (2003), junto com as mudanças na pressão de  $O_2$ , ocorrem mudanças na saturação de  $O_2$ , e também pode ocorrer hipercapnia. Outra causa importante de hipoxemia é o aumento da velocidade do fluxo sanguíneo na artéria pulmonar devido ao aumento do débito cardíaco, reduzindo o tempo de trânsito dos eritrócitos nos capilares, diminuindo consideravelmente o tempo de captação de  $O_2$ .

Segundo Camargo (2012), a hemogasometria está relacionada à análise do valor do pH, gasometria e seus derivados gasosos. Devido a fatores específicos, como metabolismo, o valor do pH, gasometria arterial e seus derivados gasosos podem ser diferentes. A hemogasometria arterial é suficiente

para determinar o equilíbrio ácido-base. Também indica infecção (ex. intestino delgado) e auxilia na avaliação da gravidade do choque. No que se refere a medição do eletrólito, são testes laboratoriais importantes para caracterizar e avaliar desequilíbrios hidroeletrolíticos e ácido-base (RIBEIRO FILHO *et al.* 2007). Segundo Leal *et al.* (2008), este teste avalia a eficácia das trocas gasosas respiratórias e dos parâmetros metabólicos (equilíbrio acidobásico). As medições dos gases sanguíneos incluem: pressão parcial de oxigênio ( $PO_2$ ), pressão parcial de dióxido de carbono ( $pCO_2$ ), pH sanguíneo, saturação de hemoglobina e concentração de bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) e eletrólitos como sódio (Na), potássio (K) e cloro (Cl). De acordo com Rognant *et al.*, (2010) para animais hospitalizados, a possibilidade de monitorar a resposta ao tratamento é importante e ajuda na escolha do melhor método para doenças metabólicas e respiratórias.

Segundo Camargo (2012), a mudança da  $pCO_2$  pode ser causada por certas doenças respiratórias, enquanto as mudanças no  $HCO_3^-$  indicam metabolismo anormal. Os componentes de gases sanguíneos são:

- pH: o pH indica a acidez ou alcalinidade da amostra. Um pH baixo é compatível com acidemia e um pH alto com alcalemia (ANDREWS; GRINDEM, 2000).
- $PO_2$ : trata-se da pressão parcial (tensão) de oxigênio em uma fase gasosa em equilíbrio com o sangue. Valores altos ou baixos indicam hipóxia e hipoxemia respectivamente. A  $PO_2$  no sangue venoso é menor do que no sangue arterial devido à extração de oxigênio pelos tecidos periféricos (RIBEIRO FILHO *et al.* 2007).
- $PCO_2$ : trata-se da pressão parcial de  $PCO_2$  em fase gasosa em equilíbrio com o sangue. O  $PCO_2$  dá uma indicação do componente respiratório dos resultados dos gases sanguíneos. Um valor alto e baixo indica hipercapnia (hipoventilação) e hipocapnia (hiperventilação), respectivamente. Um  $pCO_2$  alto é compatível com acidose respiratória e um  $pCO_2$  baixo com alcalose respiratória (ANDREWS; GRINDEM, 2000).

A hemogasometria destina-se ao uso na quantificação *in vitro* de sódio, potássio, cálcio ionizado, glicose, hematócrito, pH, pressão parcial de oxigênio



( $PO_2$ ) e pressão parcial de dióxido de carbono ( $PCO_2$ ) em artérias, veias ou sangue total capilar, conforme Oyaert *et al.* (2018), a finalidade da medição destes itens são:

- Sódio (Na): As medições de sódio são usadas para monitorar desequilíbrios eletrolíticos;
- Potássio (K): As medições de potássio são usadas no diagnóstico e monitoramento de doenças e condições clínicas que manifestam níveis altos e baixos de potássio;
- Cálcio ionizado (iCa): as medições de cálcio ionizado são usadas no diagnóstico, monitoramento e tratamento de condições, incluindo, mas não se limitando a, doença da paratireóide, uma variedade de doenças ósseas, doença renal crônica, tetania e distúrbios relacionados a cirurgia e cuidados intensivos;
- Glicose (Glu): As medições de glicose são usadas no diagnóstico, monitoramento e tratamento de distúrbios do metabolismo de carboidratos, incluindo, mas não se limitando a, diabetes mellitus, hipoglicemia neonatal, hipoglicemia idiopática e carcinoma de células das ilhotas pancreáticas;
- Hematócrito (Hct): As medições de hematócrito podem ajudar na determinação e monitoramento do status do volume total de hemácias normal ou anormal, incluindo, mas não se limitando a, condições como anemia, eritrocitose e perda de sangue relacionada a trauma e cirurgia;
- pH, pressão parcial de oxigênio ( $PO_2$ ), pressão parcial de dióxido de carbono ( $PCO_2$ ): as medições de pH,  $PO_2$  e  $PCO_2$  são usadas no diagnóstico, monitoramento e tratamento de distúrbios respiratórios e distúrbios ácido-básicos metabólicos e respiratórios. O bicarbonato é usado no diagnóstico e tratamento de vários distúrbios potencialmente graves associados a alterações no equilíbrio ácido-base corporal.

## 2.4. HOMEOSTASE ÁCIDO-BASE

A função normal de quase todos os processos fisiológicos do corpo depende da manutenção do equilíbrio ácido-básico apropriado. O valor do pH intracelular e do pH intersticial depende fortemente do valor do pH do sangue arterial, que varia entre 7,35 e 7,45 em condições fisiológicas normais. Quando o pH se desvia de sua faixa normal, enzimas dependentes do pH e proteínas de transporte de membrana podem não funcionar adequadamente e as vias metabólicas podem ser afetadas negativamente. A acidemia, que é definida como pH arterial inferior a 7,35, pode causar uma variedade de distúrbios, incluindo vasodilatação arterial, resistência à insulina, função imunológica comprometida e excitabilidade neuronal reduzida. A alcalemia, que é definida como pH arterial maior que 7,45, também pode causar muitos distúrbios, incluindo redução do fluxo sanguíneo miocárdico e convulsões. Portanto, é imperativo que o valor do pH do sangue seja rigidamente controlado.

De acordo com o National Institutes of Health, o intervalo de referência para  $[HCO_3^-]$  é 22–26 mEq / L e o intervalo de referência para  $pCO_2$  é 35–45 mmHg. No entanto, é importante reconhecer que existem diferenças entre os indivíduos que podem afetar o diagnóstico, a suscetibilidade à doença e a capacidade de resposta ao tratamento.

A extensão em que o pH extracelular ( $pHe$ ) influencia o pH intracelular ( $pHi$ ) varia dependendo do complemento das proteínas de extrusão de ácido ou de transporte de membrana de carga de ácido que uma célula expressa. Normalmente, as células expressam uma série dessas proteínas como defesa contra a acidose. O papel protetor dessas proteínas é importante para a sobrevivência celular, proliferação e migração em uma variedade de tipos de células. As ações dessas proteínas podem tornar as células sensíveis a mudanças no  $pHe$ , permitindo a permeação de ácidos e bases, ou ajudá-los a se defender contra mudanças no  $pHe$ , eliminando ou dissipando ácidos e bases para manter o  $pHi$ .

## 2.5. ACIDOSE METABÓLICA

Acidose Metabólica (MAc) pode ser caracterizada pela redução do pH sanguíneo devido a deficiência primária de carbonato ácido [ $\text{HCO}_3^-$ ] em resposta à alcalose respiratória (RAPHAEL, 2019). O organismo, com o objetivo de manter a homeostase plasmática, a curto prazo aumenta o impulso respiratório para reduzir a concentração de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) e, a longo prazo, aumenta a excreção renal de íon hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) e a formação de  $\text{HCO}_3^-$ . Entretanto, caso tais sistemas compensatórios estejam trabalhando de forma aberrante ou sobrecarregados, a acidose metabólica pode se instalar, como nos casos de dieta rica em carboidratos, doença renal crônica e diabetes (cetoacidose diabética), infarto agudo do miocárdio (acidose láctica), mutações em transportadores renais ácido-base (acidose tubular renal), intoxicação com compostos ácidos (aspirina) e diarreia (perda de  $\text{HCO}_3^-$ ) (QUADE; PARKER; OCCHIPINTI, 2021). As manifestações clínicas variam de acordo com a causa primária, mas em geral a acidose concorre com eritema, náuseas e astenia (LAZENBY, 2011).

A acidose metabólica, que resulta do acúmulo de ácidos orgânicos e / ou inorgânicos não voláteis na circulação, representa um marcador de gravidade da doença e foi proposta como um substituto para a disfunção orgânica. Parece que quanto pior é a acidose metabólica, pior é o prognóstico. No entanto, ainda há muita controvérsia a respeito da compreensão e do manejo da acidose metabólica. Um deles é baseado no excesso de base padrão (SBE) e é conhecido como abordagem de Copenhaguen; a outra é baseada na diferença de íons fortes (SID) e na concentração total de ácidos fracos não voláteis (Atot) e é chamada de abordagem físico-química. SBE é a quantidade de ácido ou base necessária para restaurar o pH para 7,4, mantendo valores fixos de  $\text{pCO}_2$  (40 mmHg) e temperatura (37 °C) e padronizado para um valor de hemoglobina de 5 g / dL, o que parece aumentar a precisão do SBE in vivo e (quase) independentemente das variações agudas de  $\text{pCO}_2$ . A acidose metabólica está presente quando o valor de SBE é negativo, geralmente abaixo de -2 mEq / L. SID é a diferença líquida entre cátions fortes (basicamente,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) e ânions ( $\text{Cl}^-$  e lactato-) no plasma, com os ácidos fracos não voláteis

mais relevantes sendo a albumina dissociada e o fosfato. A acidose metabólica é o resultado da diminuição do SID ou do aumento dos ácidos fracos (WOOTEN, 2003).

A substituição de bicarbonato de sódio em pacientes com perda de bicarbonato de sódio devido a diarreia ou acidose tubular proximal renal é útil, mas não há evidências definitivas de que a administração de bicarbonato de sódio a pacientes com acidose metabólica aguda, incluindo cetoacidose diabética, acidose láctica, choque séptico, metabólico intraoperatório acidose, ou parada cardíaca, é benéfica em relação aos resultados clínicos ou taxa de mortalidade. Pacientes com doença renal crônica avançada geralmente apresentam acidose metabólica devido ao aumento de ânions não medidos e hiperclorêmia. Foi sugerido que a acidose metabólica pode ter um impacto negativo na progressão da disfunção renal e que a administração de bicarbonato de sódio pode atenuar esse efeito, mas uma avaliação adicional é necessária para validar essa estratégia renoprotetora. O bicarbonato de sódio é o tampão predominante usado nos fluidos de diálise e os pacientes em diálise de manutenção são submetidos a uma carga de bicarbonato de sódio durante as sessões, sofrendo uma alcalose metabólica transitória de gravidade variável. Os efeitos colaterais associados à terapia com bicarbonato de sódio incluem hipercapnia, hipocalemia, hipocalcemia ionizada e prolongamento do intervalo QTc. O impacto potencial da terapia regular com bicarbonato de sódio no agravamento das calcificações vasculares em pacientes com doença renal crônica não foi suficientemente investigado (ADEVA-ANDANY et al., 2012)

A análise dos gases sanguíneos inclui três parâmetros relacionados ao conteúdo de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) do sangue: concentração total de dióxido de carbono no sangue ( $\text{tCO}_2$ ), pressão parcial plasmática de dióxido de carbono ( $\text{pCO}_2$ ) e concentração de bicarbonato plasmático ( $\text{HCO}_3^-$ ) (AIKEN, 2013; BEREND, 2013).

O  $\text{pCO}_2$  plasmático é medido por analisadores de gases sanguíneos e indica a pressão exercida pela pequena porção (aproximadamente 5%) do dióxido de carbono total dissolvido na fase aquosa do plasma. A concentração de bicarbonato plasmático é geralmente estimada a partir dos valores medidos de pH e  $\text{pCO}_2$  quando analisadores de gases sanguíneos são utilizados. O  $\text{tCO}_2$  é medido quimicamente por analisadores de laboratório e reflete a quantidade

total de dióxido de carbono presente no sangue, que corresponde principalmente à soma de bicarbonato e dióxido de carbono dissolvido ou  $pCO_2$  (AIKEN, 2013; NASIR et al., 2010)

A relação entre o pH e o  $pCO_2$  usado para calcular a concentração de bicarbonato no plasma é descrita pela equação de Henderson-Hasselbalch derivada da aplicação da lei de ação da massa para as reações de hidratação e dissociação do ácido carbônico ( $H_2CO_3$ ) no plasma:



A constante de equilíbrio para a primeira reação (K 1) é

$$K_1 = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2][H_2O]}$$

A constante de equilíbrio para a segunda reação (K 2) é

$$K_2 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

A equação de Henderson-Hasselbalch usada para o cálculo do bicarbonato de plasma é:

$$pH = pK_a + \log \frac{[HCO_3^-]}{\alpha \times pCO_2}$$

O valor de  $pK_a$  para esta equação é obtido a partir de uma constante de equilíbrio combinada incluindo os valores de K 1 e K 2. O  $pK_a$  desta nova constante combinada (6.1) é usado no cálculo da concentração de bicarbonato no plasma.  $\alpha$  é o coeficiente de solubilidade do gás dióxido de carbono (igual a 0,0306 para plasma a 37 ° C).

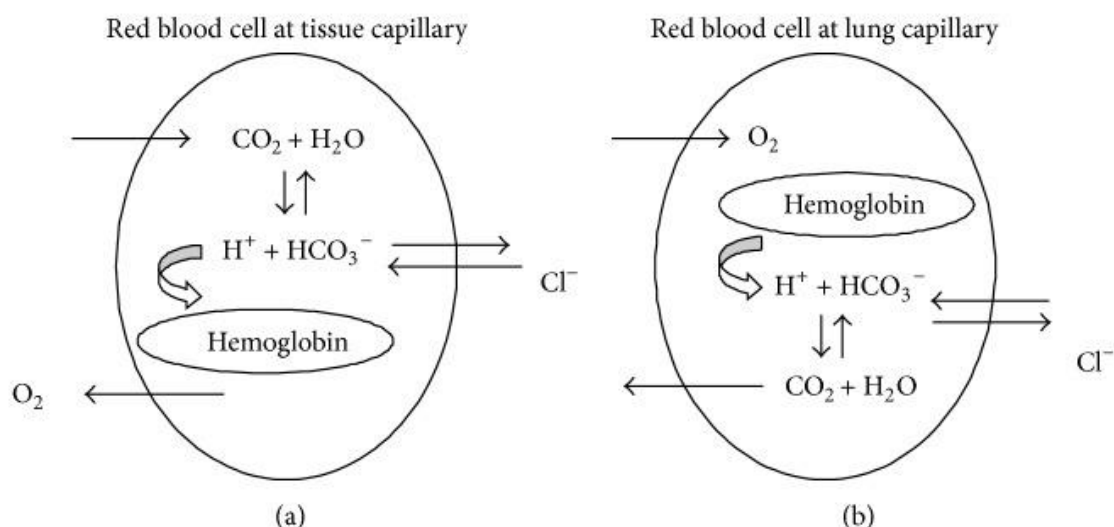
Substituindo esses valores,

$$pH = 6,1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{0,03 \times pCO_2}. \text{ (KUMAR e KARON, 2008)}$$

Os analisadores de gases sanguíneos usam esta fórmula para estimar a concentração de bicarbonato no plasma a partir de valores conhecidos de pH e  $pCO_2$ . No entanto, a aplicação desta equação para o cálculo da concentração de bicarbonato no plasma humano pode ser enganosa, pois a hidratação do dióxido de carbono in vivo requer a ação de isoenzimas da anidrase carbônica que estão ancoradas à membrana plasmática dos glóbulos vermelhos ou encontram-se dentro dos eritrócitos. A atividade das isoenzimas da anidrase carbônica não foi relatada no plasma humano em quantidade suficiente para conduzir significativamente a hidratação do dióxido de carbono neste local. Além disso, as isoformas da anidrase carbônica catalisam a hidratação reversível do

dióxido de carbono em bicarbonato sem a formação intermediária de ácido carbônico (Figura 2) (SLY e HU, 1995).

Portanto, o uso de um pKa combinado pode não ser apropriado, uma vez que não há formação de ácido carbônico in vivo. Por essas razões, a aplicação da equação de Henderson-Hasselbalch ao cálculo da concentração de bicarbonato no plasma não é direta e o significado fisiológico do valor de bicarbonato do plasma estimado a partir da aplicação desta equação ao plasma humano permanece incerto.



**Figura 02: Reação de anidrase carbônica**(ScientificWorldJournal. 2014; 2014: 627673. Published online 2014 Oct 21. doi: 10.1155/2014/627673 PMID: 25405229 Sodium Bicarbonate Therapy in Patients with Metabolic Acidosis María M. Adeva-Andany)

O tCO<sub>2</sub> no sangue determinado por analisadores de laboratório e a concentração de bicarbonato plasmático calculada a partir de analisadores de gases sanguíneos de ponto de atendimento são geralmente considerados equivalentes e o tCO<sub>2</sub> é geralmente medido como um substituto para o nível de bicarbonato plasmático, embora alguns estudos tenham encontrado uma concordância pobre entre os dois parâmetros [3, 5].

O excesso de base é definido como a quantidade de Base (NaOH) ou ácido (HCL) em mEq adicionado ao sangue estabilizado com PCO<sub>2</sub> = 40mmHg e à temperatura de 37°C para atingir um pH de 7,40 [20].

O SBE desempenha um papel importante na descrição do estado ácido-básico de um paciente e vem ganhando interesse clínico. Além do teste rápido,

da idade, do escore de gravidade da lesão e da escala de coma de Glasgow, o BE está se tornando cada vez mais importante para identificar o risco de mortalidade para pacientes com lesões múltiplas. Segundo Zander, o SBE é calculado pelo pH, PCO<sub>2</sub>, concentração de hemoglobina e saturação de oxigênio da hemoglobina (SO<sub>2</sub>). O uso de SO<sub>2</sub> permite ao analisador de gases sanguíneos determinar apenas um valor de BE, independente do tipo de amostra de sangue analisada: arterial, venosa mista ou venosa. O SBE e a medida da concentração de lactato (cLac) desempenham um papel importante no diagnóstico de pacientes críticos. Em geral, a mudança em SBE corresponde à mudança em cLac. Se o DeltaBE for menor do que o DeltacLac, o motivo pode ser a terapia com HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mas também com soluções de infusão contendo lactato.

## **2.5. INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA SEPSE**

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 exibir variabilidade entre os animais. São conhecidos três modelos experimentais para indução da sepse: a administração intravenosa da bactéria viva ou componente microbiana, 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 (BENJAMIN, 2001).

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, que pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (BENJAMIN, 2001).

## **2.6. DIAGNÓSTICO**

Infecção e sepse são acompanhadas por sinais clínicos e laboratoriais, como mudanças na temperatura corporal, leucocitose e taquicardia. Porém, estes sinais e sintomas de inflamação sistêmica, além de não serem específicas 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 E FIELDS, 2012).

Na última década, inúmeros marcadores têm sido sugeridos para o diagnóstico precoce da sepse, dentre os quais está à 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).

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 (BARBOSA et al., 2004).

O aumento da temperatura corporal é, geralmente, o primeiro sinal de inflamação sistêmica. Durante a evolução para sepse, o paciente pode apresentar hipotermia, que é um sinal prognóstico ruim. A contagem de leucócitos pode estar aumentada, podendo indicar infecção, porém sabe-se que a leucocitose pode estar presente em outras situações, como hemorragias



gastrointestinais, transfusão sanguínea e uso de corticosteroides (Barbosa et al., 2004).

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 indicadores precoces de SRIS, ainda que a maioria deles não esteja disponível de forma rápida (BOCHUD, 2001).

### **3. OBJETIVOS GERAIS**

Mimetizar o modelo da sepse, e avaliar a progressão dos sinais da síndrome sepse, comparando com os parâmetros clínicos e laboratoriais em ratos wistar submetidos ao modelo experimental de sepse induzidos por ligadura e punção cecal.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar a hemogasometria em ratos wistar submetidos ao modelo experimental de sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP);

Avaliar microscopicamente lesões em órgãos importantes como fígado, rins e pulmão;

Avaliar a pressão arterial durante a síndrome sepse;

Avaliar laboratorialmente os animais durante a síndrome sepse.

### **4. JUSTIFICATIVA**

Embora a Acidose Metabólica seja um distúrbio comum e de alta mortalidade em pacientes com síndrome SEPSE, os padrões dos distúrbios ácido-base na síndrome ainda não foram avaliados objetivamente.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de cirurgia e anestesia da Unidade de Experimentação Animal (UEA) da Universidade Estadual Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e submetido à Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) sob o número 124447.

### 5.1. INDUÇÃO DA SÍNDROME SEPSE

Foram utilizados 4 ratos wistar (*rattus norvegicus*), machos, pesando entre 300 e 350 gramas. Após a indução da sepse, os animais foram separados em gaiolas individuais com regime liberal de água e comida e abrigados em ambiente com temperatura controlada em 20 graus celsius.

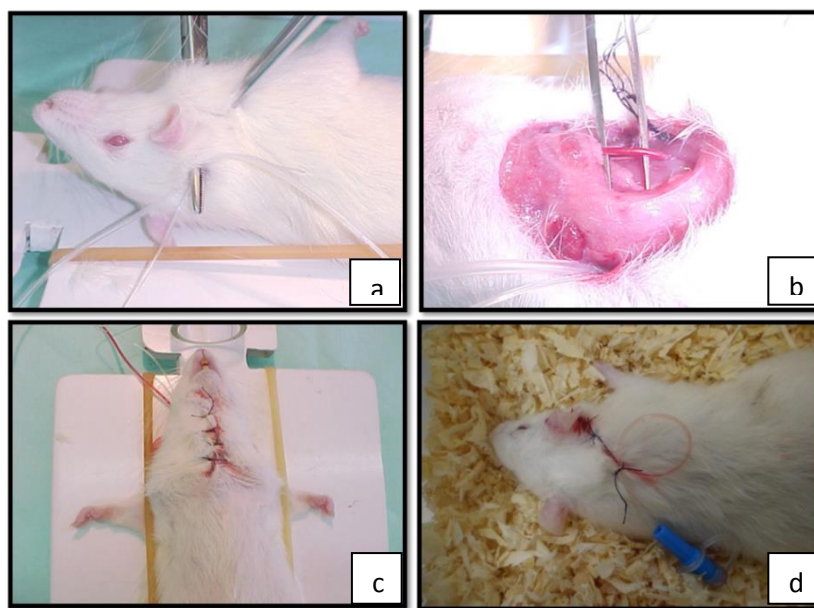
Os animais foram anestesiados com cetamina ( $100 \text{ mg. Kg}^{-1}$ ) associada ao xilazina ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), aplicados na mesma seringa, por via intraperitoneal e para manutenção a anestesia inalatória com o Halotano. Após cerca de 10 minutos da aplicação intraperitoneal, os animais então eram colocados sobre uma calha cirúrgica adaptada, onde recebiam tricotomia da região abdominal, região torácica e na região ventral do pescoço, para o posterior punção da artéria carótida, por dissecção e visualização direta. Nos locais onde houve tricotomia, os animais recebiam aplicação de solução de clorexidina degermante, seguida de solução de clorexidina alcoólica (Figura 03).



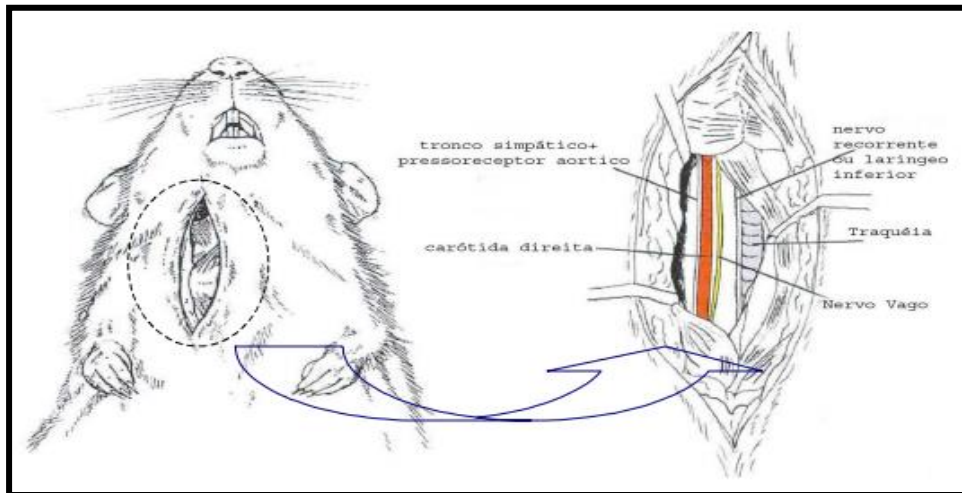
**FIGURA 03: Posicionamento e tricotomia do animal sobre calha cirúrgica adaptada.**

Após a entrada em plano anestésico (percebida pela não reação à preensão digital com pinça hemostática) e tricotomia, os ratos eram colocados em calha cirúrgica adaptada para início do procedimento. Para implantação da cânula, foi

realizada uma incisão na região cervical ventral do pescoço (Figura 05) 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 4a). Continuou-se a dissecção dos músculos esternocleidomastóideo e hioide para exposição da artéria carótida, localizada paralelamente à traqueia (Figura 4b). A artéria foi dissecada para separação do nervo vago e iniciou-se a implantação da cânula (Figura 4c). O posicionamento da cânula neste local é importante para coleta de sangue após o retorno da anestesia (Figura 4d).



**Figura 04-a. Passagem da cânula arterial; b. Dissecção da artéria carótida; c. Aparência após a sutura da região ventral do pescoço; d. Cânula arterial fixada para a mensuração da pressão arterial invasiva. (Arquivo pessoal). HV – UENF, 2021**



**Figura 5 - Ilustração da localização da artéria carótida. Fonte: Pureza, 2006.**

Após a canulação foi realizada então uma incisão na pele, na linha média do abdomen e uma pequena dissecação do tecido subcutâneo, quando então era feita a abertura da cavidade abdominal, sobre a linha alba, com lâmina de bisturi número 11. Após a abertura da cavidade abdominal, o ceco era visualizado e exposto manualmente para fora do abdômen (figura 06). O restante dos intestinos delgado e grosso eram mantidos naturalmente dentro do abdomen.



**Figura 06: Exposição do ceco para dissecação mesentérica.**

Neste momento, era realizada a dissecação do mesentério do ceco, próximo a válvula ileocecal, com extremo cuidado para não lesionar o ramo cecal da artéria ileocecal, o que poderia levar a um quadro de hemorragia e óbito do

animal em questão. Além disso, esta etapa é fundamental para evitar a isquemia do ceco durante o procedimento de ligadura e punção, nos grupos pertinentes.

Após a abertura da cavidade abdominal, exteriorização do ceco e dissecação do mesentério, o ceco foi recolocado em sua posição original e a cavidade abdominal foi fechada com pontos simples separados, com fio de náilon de espessura 3-0 e então se deu o fechamento do espaço subcutâneo e pele, também com fio de náilon de espessura 3-0 (figura 07). Depois da abertura e sutura, os animais foram colocados em suas respectivas gaiolas individuais, até a reavaliação em 1 e 2 horas.



**Figura 07: Fechamento da cavidade abdominal após exposição do ceco e dissecação mesentérica.**

Os animais receberam os procedimentos de ligadura e punção do ceco (CLP), para indução da sepse. Primeiro foi escolhida a porção do ceco a ser ligada e puncionada. Foi padronizada a ligadura cecal larga, próxima à válvula ileocecal, que corresponde à ligadura em torno de 50% da área do ceco, com o objetivo de indução em curto período da sepse nos animais testados.

Após exposição do ceco e dissecação do mesentério (figura 08), um fio de seda, com espessura número 2-0, era passado entre o ceco e o espaço da dissecação do mesentério e então era feita a ligadura da região selecionada, com cuidado para não causar isquemia ou laceração nesta região do ceco. Antes da

ligadura, o conteúdo fecal era gentilmente manuseado e deslocado em direção à região distal do ceco, para facilitar o processo de punção (figura 09).



**Figura 08: Passagem do fio pelo mesentério, evitando a artéria ileocecal (ramo cecal).**



**Figura 09: Deslocamento do conteúdo fecal para ligadura na porção proximal da válvula ileocecal.**

Após a ligadura (figura 10), era introduzida uma agulha calibre 18 (40 x 1,2 mm) na região proximal do ceco, atravessando este completamente, sempre no sentido da borda mesentérica para a borda antimesentérica, com o cuidado de não acertar nenhum leito vascular no trajeto da agulha (figura 11). A agulha sera removida e então se realizará uma suave compressão no local da punção, com o objetivo de exteriorizar uma pequena quantidade de fezes, tanto no orifício da borda mesentérica, quanto no orifício da borda antimesentérica (figura 12). A

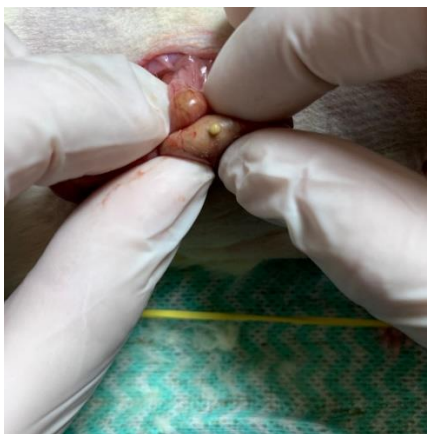
quantidade de exposição de material fecal era limitada e sempre a mesma em todos os animais do experimento submetidos ao protocolo.



**Figura 10: Ligadura realizada no terço proximal do ceco, próximo à válvula ileocecal.**



**Figura 11: Transposição de agulha 18G sobre a porção proximal do ceco.**



**Figura 12: Exteriorização de conteúdo fecal com manipulação suave do ceco.**

Depois disto, o ceco era então realocado dentro da cavidade abdominal, com o cuidado de não haver contato das fezes expostas com a abertura da parede abdominal. Assim feito, o peritônio e a parede abdominal eram fechados com fio



de náilon de espessura 3-0, seguido do fechamento do tecido subcutâneo e pele com o mesmo tipo de fio, ambos com pontos simples descontínuos.

Todos as ligaduras e punções cecais nos animais do experimento tiveram o cuidado de manter um tempo médio de realização do procedimento entre 10 e 15 minutos, evitando manipulações e exposições excessivas que pudessem comprometer o resultado.

Os animais eram então colocados em suas gaiolas individuais, com livre acesso à água e comida, para recuperação anestésica e assim permaneciam nas 2 horas seguintes à indução da sepse, quando então eram reavaliados, a cada 1 hora, para parâmetros clínicos como tremores, pelos arrepiados, mal-estar e fraqueza muscular (figura 13).



**Figura 13: Manifestação clínica de pelos arrepiados 24 horas após ao procedimento de CLP.**

## **5.2. ANÁLISE LABORATORIAL**

A cada 1 hora será realizada a coleta de sangue para realização da hemogasometria, hemograma, para as avaliações de plaquetas e leucometria; e bioquímica sérica onde foram dosados os biomarcadores renais, uréia e creatinina.

As diretrizes regulamentares para ensaios de fármacos geralmente sugerem a realização de exames clínicos e laboratoriais como: análises hematológicas e bioquímicas e exames anatomopatológicos para avaliação em estudos de toxicidade crônica e subcrônicas (LIVESEY, 1987). Durante a avaliação do “status” sanitário dos animais, será estabelecido um protocolo sistemático de exames clínicos, além da observação de comportamento, consumo de água e ração, frequência cardíaca e temperatura.

Durante e após o experimento, foram coletados 0,5 ml de sangue, após o fechamento da cavidade abdominal (T0), uma hora após a primeira coleta (T1), duas horas após a primeira coleta (T2). E a mensuração foi realizada a cada 1 hora por um período pré-determinado de 2 horas.

Com o correto posicionamento e fixação do cateter, o mesmo foi acoplado ao sensor do equipamento BioAmp, responsável pela codificação das informações de pressão arterial e amplificação do sinal na forma de gráficos para o computador.

Simultaneamente, os dados de pressão arterial invasiva e traçado eletrocardiográfico começaram a ser registrados pelo monitor multiparamétrico ADInstruments®, sendo reconhecidos e gravados pelo programa Labchart Pro 7.3.4, do mesmo fabricante, para análise.

A pressão arterial foi aferida a cada 1 hora, a cânula foi preenchida com solução fisiológica a 0,9% heparinizada depois da mensuração da pressão arterial. Seguiu-se pela coleta de sangue para realização do hemograma, para as avaliações de plaquetas e leucometria; e bioquímica sérica onde foram dosados os biomarcadores renais, uréia e creatinina.

Após a eutanásia, a carcaça dos animais será realizada a necrópsia dos animais, coleta das amostras viscerais e de órgãos, e serão encaminhados para o setor de patologia. As amostras serão fixadas em formalina neutra tamponada a 10%, por, no mínimo 48 horas, temperatura ambiente e, posteriormente, processado segundo técnicas histológicas de rotina. As amostras serão clivadas e acondicionadas em histossetes devidamente identificados, submetidos ao processamento automático para as etapas de desidratação em banhos de alcoóis, clarificação ou diafanização em banhos de xilol, embebição em parafina,

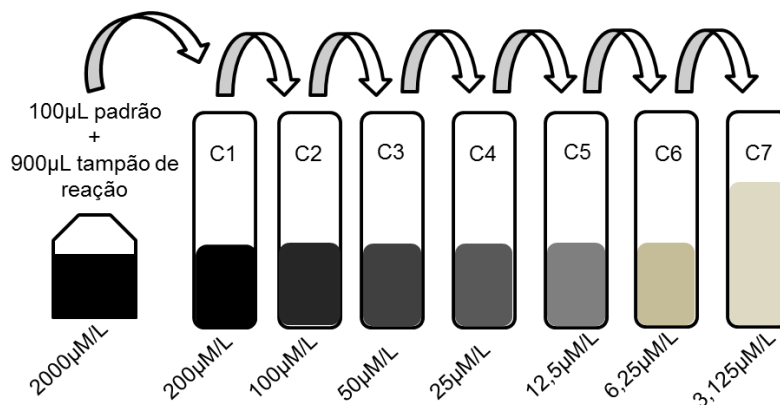
inclusão de parafina, seguido da microtomia, coloração de hematoxilina e Eosina (HE) e montagem das lâminas.

As lâminas serão avaliadas utilizando-se microscopia óptica, observando-se características morfológicas celulares e padrões teciduais.

### 5.3. ÓXIDO NÍTRICO

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 µmole/L em 7 tubos. A diluição da solução para obtenção da curva padrão de nitrito foi realizada conforme demonstrada abaixo (**Figura 14**).



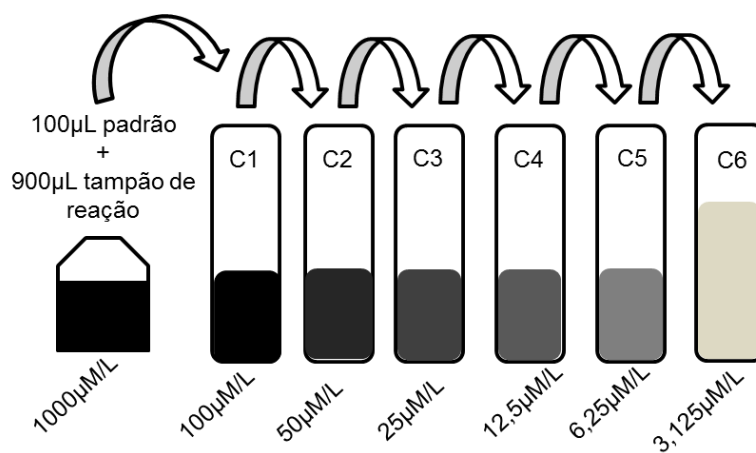
**Figura 14** - Diluição das soluções padrão a partir da solução padrão concentrada e da solução padrão de diluição.

C1: 200 µmole/L; C2: 100 µmole/L (500µL padrão + 500µL C1); C3: 50 µmole/L (500µL padrão + 500µL C2); C4: 25 µmole/L (500µL padrão + 500µL C3); C5: 12,5 µmole/L (500µL padrão + 500µL C4); C6: 6,25 µmole/L (500µL padrão + 500µL C5); e C7: 3,125 µmole/L (500µL padrão + 500µL C6).

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 foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão de reação. Nos poços da curva padrão foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  do padrão de nitrito e 50  $\mu\text{L}$  de tampão de reação. Nos poços destinados as amostras, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  da amostra e 50  $\mu\text{L}$  da solução padrão. Em todos os poços, exceto no branco, foram adicionados o 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 Elisa.

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 15**).



**Figura 15** - 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 padrão, do branco e das amostras na placa. Todas as amostras e soluções padrão foram realizadas em duplicata.

Nos poços do branco foram adicionados 200 µl de tampão de reação. Nos poços da curva padrão foi adicionado 50 µl do padrão de nitrato. Nos poços destinados as amostras foram adicionadas 50 µl da amostra. Em todos os poços da placa foram adicionados 25 µl 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 Elisa.

De acordo com as concentrações padrão e dos valores de absorbância, as curvas padrão 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.

## **5.5. HISTOPATOLOGIA**

A remoção do órgão foi realizada com material cirúrgico apropriado. A porção do rim selecionada foi colhida e imediatamente fixada em formalina neutra tamponada a 10%, e todo o material fixado por um período mínimo de 48 horas e encaminhadas ao Laboratório de Morfologia e Patologia Animal – LMPA da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro -UENF.

A seguir todas as amostras foram clivadas em fragmentos menores de até 2-3 mm de espessura e acondicionadas em histossetes plásticos para posterior processamento em processador automático (Leica® TP1020), onde foram desidratadas em cinco banhos sequenciais de álcool etílico, sendo o primeiro banho em álcool a 70%, o segundo em álcool a 90% e os seguintes em álcool absoluto, com duração de uma hora cada. Seguido da clarificação das amostras por imersão em dois banhos de xilol, de uma hora cada e embebição por imersão das amostras em dois banhos, de 30 minutos cada, em parafina histológica a 60°C. Em sequência o material foi incluído manualmente, com auxílio do dispensador de parafina e de moldes metálicos, no próprio histossete em que foi acondicionado.

Após a solidificação, os blocos foram resfriados e cortados em seções de 5 µm de espessura, em micrótomo semi-automático (Leica® RM2145) e os cortes colocados em banheira histológica, onde foram coletados por lâminas de vidro e corados manualmente. Foi utilizada hematoxilina-eosina na tentativa de observar-se pela microscopia óptica e análise de imagens.

As fotomicrografias obtidas foram documentadas e arquivadas utilizando máquina fotográfica digital Nikon® Coolpix 995, adaptada em microscópio óptico (Olympus®2 BX 41).

As lâminas foram apresentadas ao histopatologista aleatoriamente para que não houvesse influência durante a análise. Os resultados histológicos foram obtidos e foi estipulada uma graduação em valores de acordo com o comprometimento do tecido renal que foi avaliado através de mediana dos escores (estatística descritiva).

**Tabela 1:** Tabela de escore de alterações histopatológicas nos tecidos renais de ratos Wistar machos após sepse induzida experimentalmente. (colocar a literatura)

<b>Escore das alterações histopatológicas</b>	
<b>0</b>	<b>Ausente</b>
<b>1</b>	<b>Sutil</b>
<b>2</b>	<b>Leve</b>
<b>3</b>	<b>Moderada</b>

4	Grave
---	-------

## 5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos valores numéricos foram utilizados os seguintes testes, com  $p < 0,05$ :

- ✓ Kruskal – Wallis: para observar se haverá diferença estatística entre os tempos;
- ✓ Friedman: análise, dentro de cada tempo;
- ✓ Dunnett's: para analisar se houve diferença estatística no parâmetro PCO<sub>2</sub>;
- ✓ Newman-Keuls: para analisar as diferenças estatísticas nos parâmetros BE<sub>ecf</sub>, HCO<sub>3</sub>, TCO<sub>2</sub>, iCa e Glicemia.

## 6. RESULTADOS

Durante a realização do experimento e observação dos animais, foi mensurada a pressão arterial. Conforme pode ser observado, as pressões arteriais sistólica, média e diastólica apresentaram uma diminuição gradativa, tornando-se significativa em M3 (**Figuras 16**).

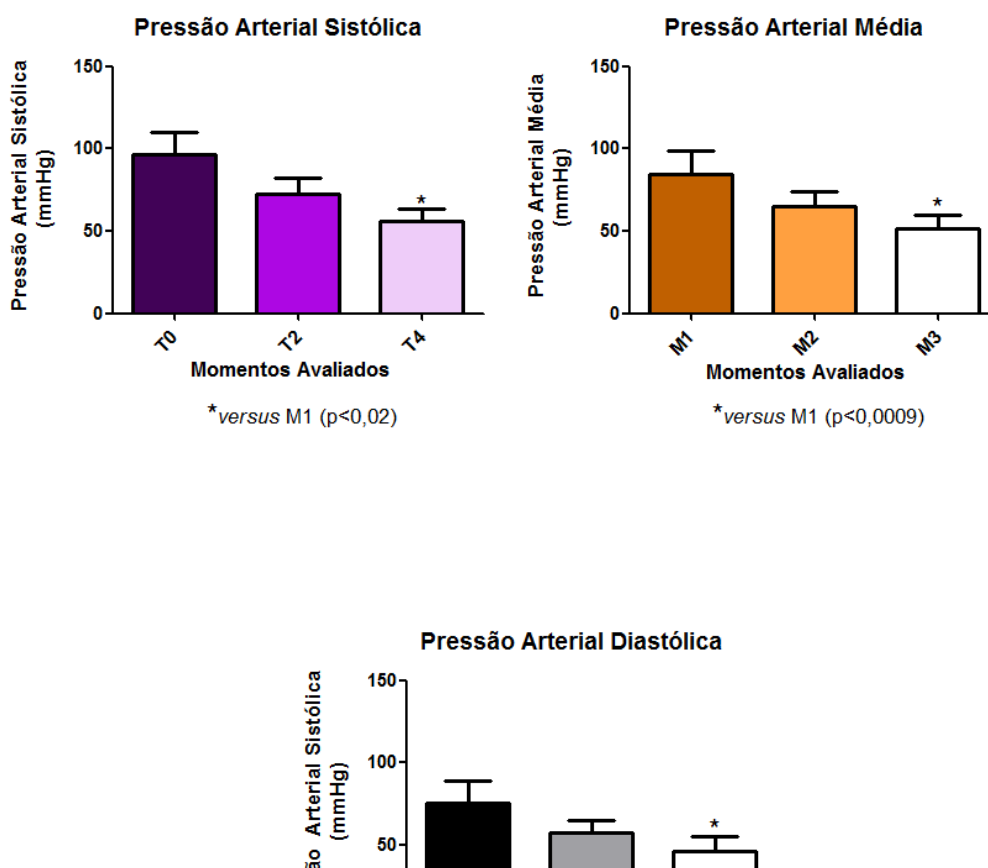


Figura 16: Avaliação da Pressão Arterial invasiva dos ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Nos valores do Hematócrito e Hemoglobina não foi observado diferença estatística entre os tempos de avaliação (**Figura 17**).

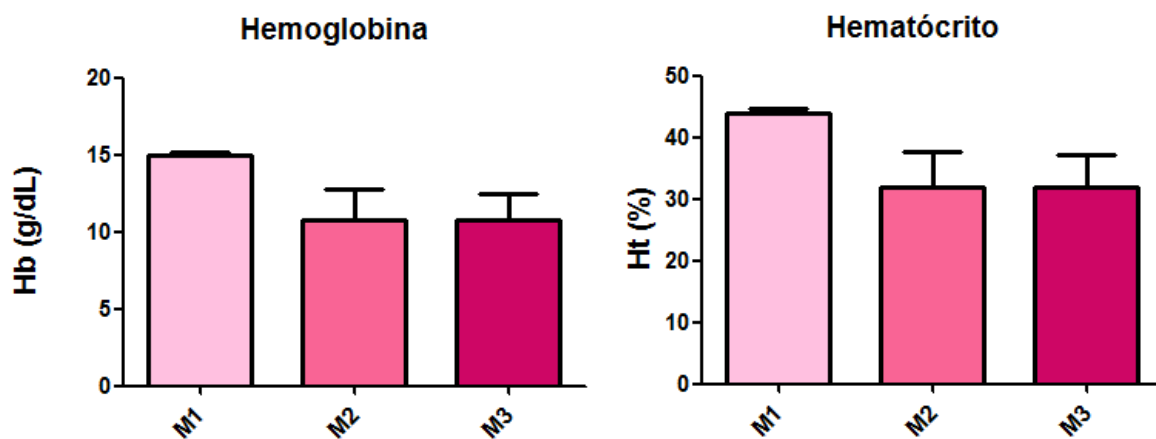


Figura 17: Avaliação laboratorial do hematócrito e hemoglobina de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Observou-se que houve diferença estatística na avaliação do número de plaquetas no período e M3 em relação aos tempos M1 (**Figura 18**).



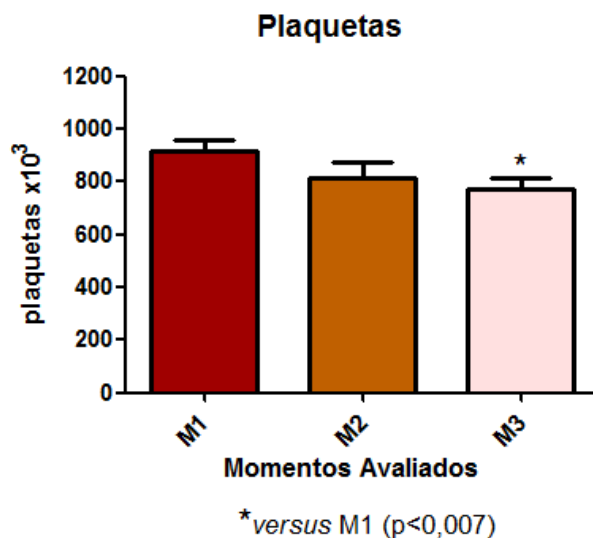


Figura 18: Avaliação laboratorial do número de plaquetas de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Foi observado o aumento na contagem dos leucócitos seguindo o mesmo padrão, ou seja, aumento gradual, tornando-se significativo em T3 e T4 (Figura 19).

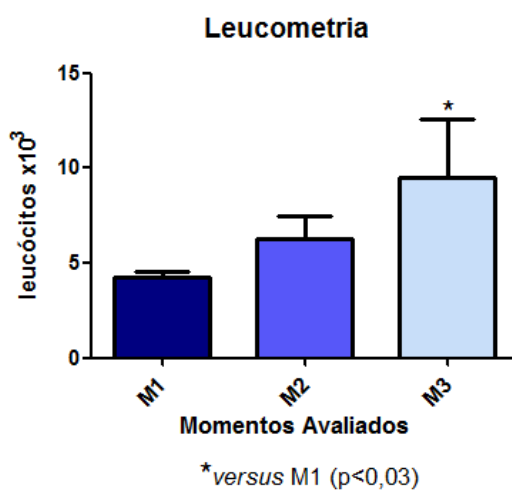


Figura 19: Avaliação laboratorial do número de leucócitos de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Foi observado que a sepse promoveu aumento da concentração plasmática de creatinina. De forma semelhante a creatinina, os níveis elevados de uréia plasmática também indicam que os animais apresentaram um considerável comprometimento da função renal. (Figuras 20a e 20b)

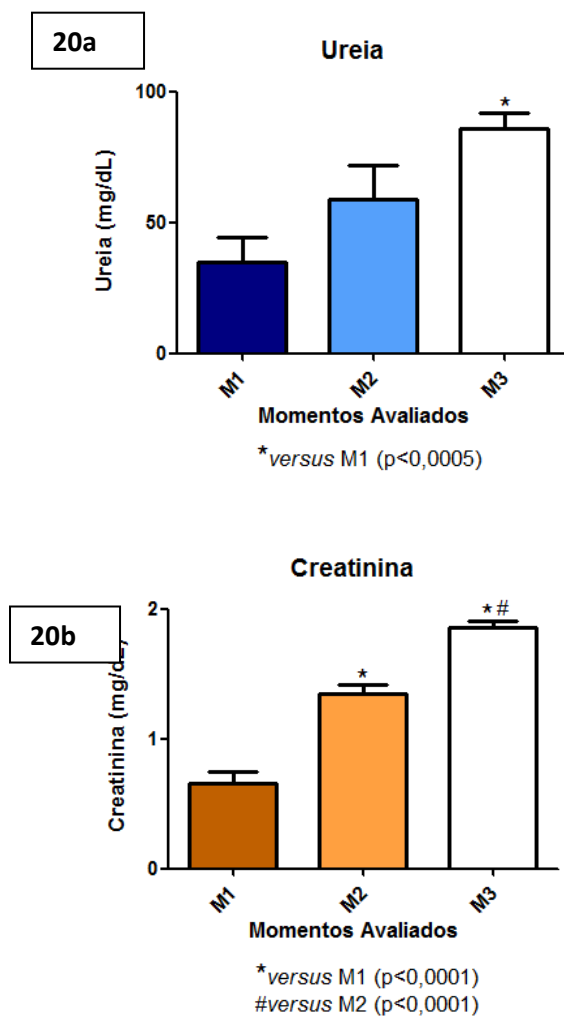


Figura 20: Avaliação laboratorial da bioquímica sérica (uréia e creatinina) de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Os valores de pH não apresentaram diferença estatística e estão representados pela figura 21.

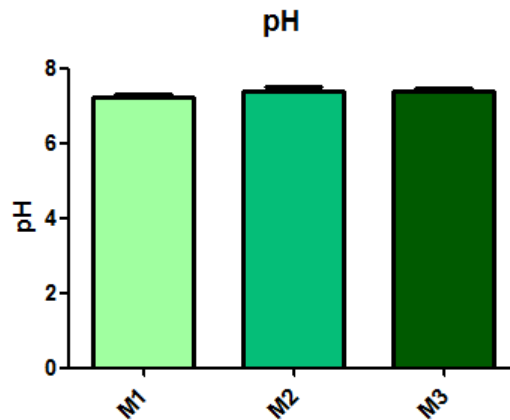


Figura 21: Avaliação laboratorial do pH de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

De acordo com os resultados obtidos na mensuração do pCO<sub>2</sub>, nota-se uma diferença estatística entre o tempo M1 e o M2 de acordo com a figura 22.

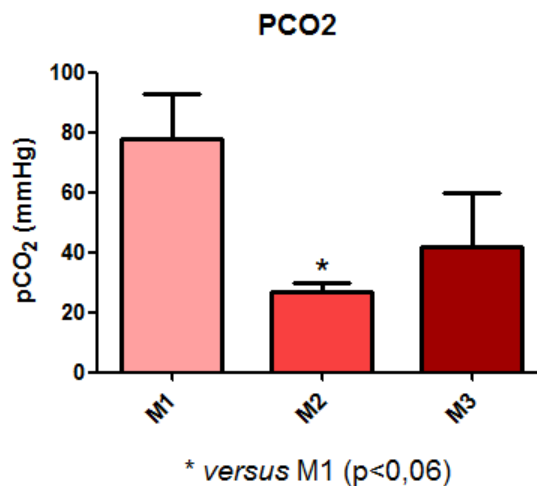


Figura 22: Avaliação laboratorial do pCO<sub>2</sub> de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Observou-se que os valores obtidos por pO<sub>2</sub> não houve diferença significativa com p<0,06, de acordo com a figura 23.

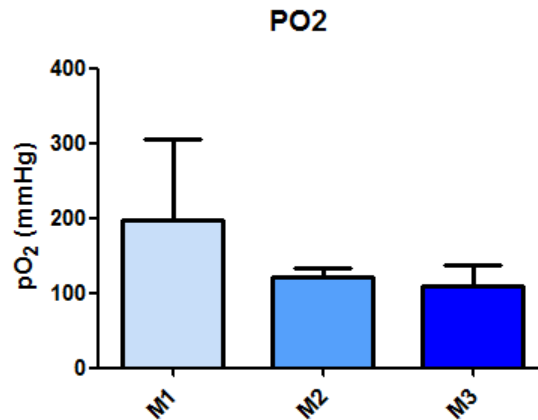
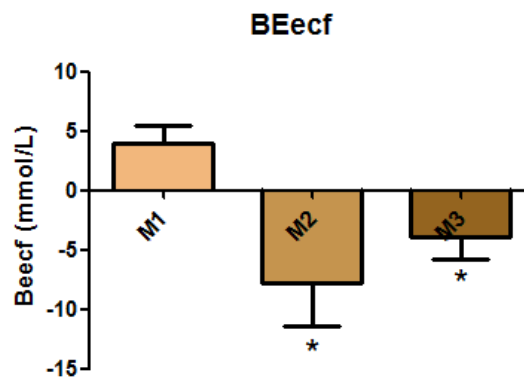


Figura 23: Avaliação laboratorial do pO<sub>2</sub> de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

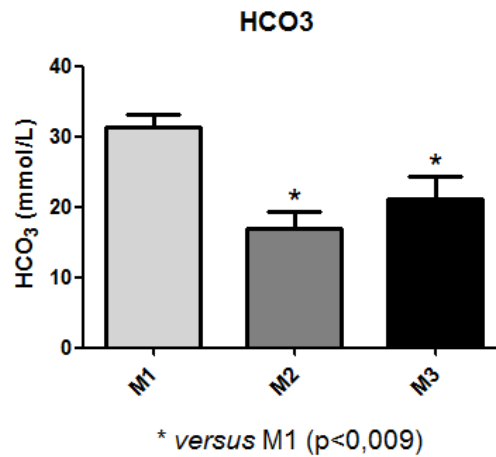
Para os valores de Excesso de Base nota-se diferença estatística entre os tempos M1 e M2, e entre M1 e M3, de acordo com a figura 24.



\* versus M1 ( $p < 0,02$ )

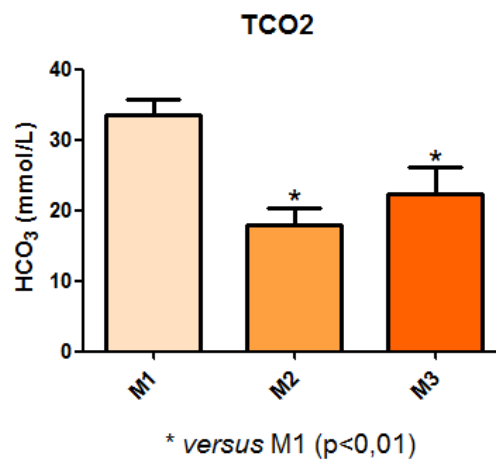
Figura 24: Avaliação laboratorial do BE<sub>ecf</sub> de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Na avaliação dos dados do HCO<sub>3</sub>, observou diferença estatística entre os tempos M1 e M2 e M1 e M3, conforme a figura 25.



**Figura 25:** Avaliação laboratorial do HCO<sub>3</sub> de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Nota-se também que os valores obtidos para o tCO<sub>2</sub> também obtiveram diferença estatística entre os tempos M1 e M2, e M1 e M3 conforme a figura 26.



**Figura 26:** Avaliação laboratorial do TCO<sub>2</sub> de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

A avaliação da saturação de oxigênio não houve diferença estatísticas nos valores obtidos entre os tempos mensurados, o que é demonstrado na figura 27.

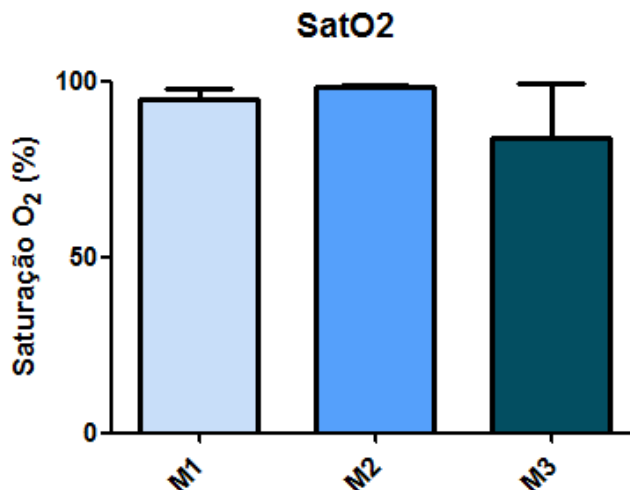


Figura 27: Avaliação laboratorial da SatO<sub>2</sub> de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Os valores referentes a Sódio e Potássio não obtiveram diferença estatística dentre os tempos de mensuração, conforme a figura 28.

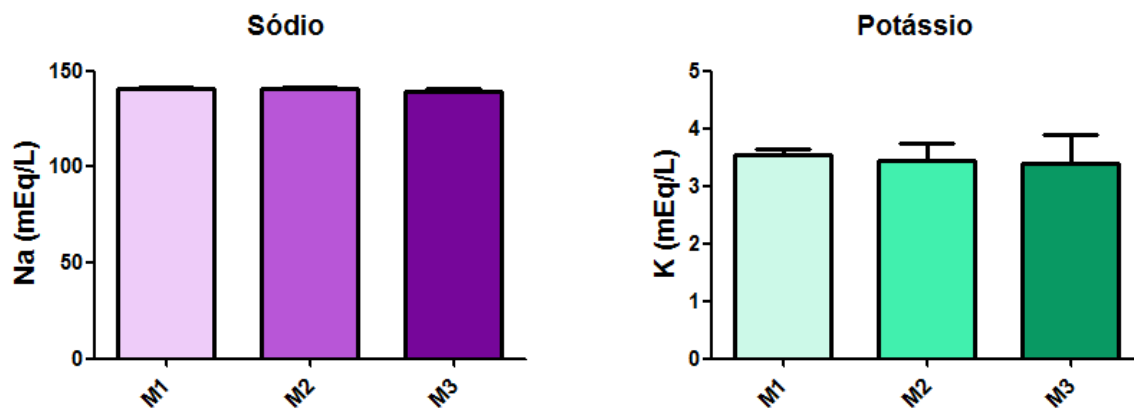


Figura 28: Avaliação laboratorial de Sódio e Potássio de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Os valores obtidos na mensuração do cálcio ionizado, nota-se diferença estatística entre os tempos M1 e M2, e M1 e M3, conforme demonstrado na figura 29.

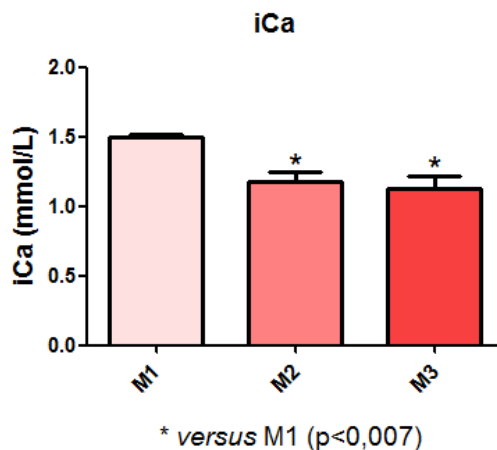


Figura 29: Avaliação laboratorial de iCa de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

A glicemia variou durante o experiento e apresentou diferença estatística entre os tempos M1 e M3, e M2 e M3, conforme a figura 30.

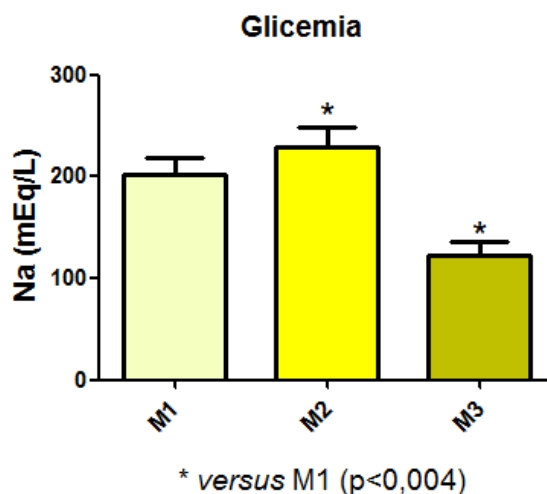
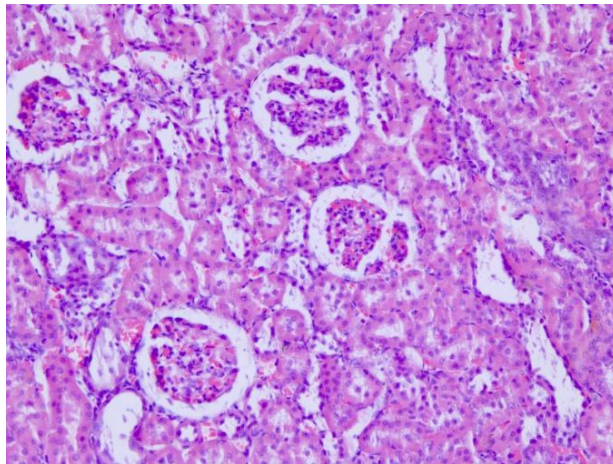
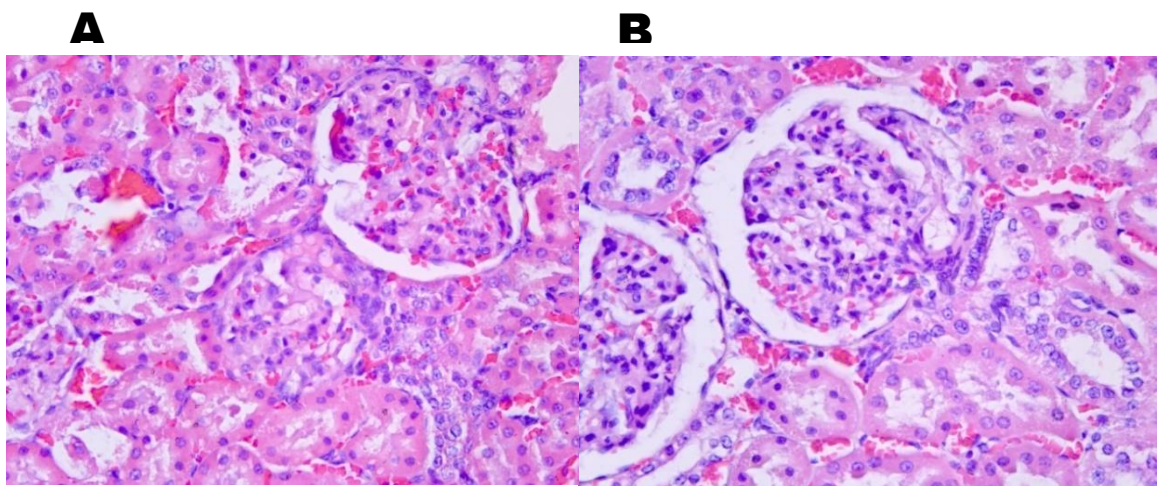


Figura 30: Avaliação laboratorial da glicemia de ratos wistar machos (250-300g) submetidos a sepse pela punção cecal, avaliados a cada hora, sendo M1 o momento inicial.

Em relação à avaliação histológica dos rins dos animais, o escore de avaliação permaneceu entre 0 e 2 (de ausente a leve). Foi observada degeneração hidrópica no córtex renal dos animais em sepse (**Figura 31**), quando comparado ao grupo controle (**Figura 32**), além de necrose leve, perda proteica e sinal de regeneração renal.



**Figura 31 - Fotomicrografia (aumento 40X) de córtex renal de ratos wistar machos (250-300g) normais. Coloração Hematoxilina-Eosina.**



**Figura 32 - Fotomicrografia (aumento 40X) de córtex renal de ratos wistar machos (250-300g) submetidos à sepse pela punção cecal.**



## 7. DISCUSSÃO

Neste modelo de produção de sepse induzida por peritonite fecal experimental optou-se pelo rato Wistar, devido à facilidade em induzi-la e possível comparação entre os grupos de animais. O modelo de ligadura cecal seguida de punção desse órgão (LPC), para promoção de sepse, foi escolhido devido à simplicidade para executar esse procedimento e por fornecer contaminação de flora mista, assemelhando-se a condições clínicas humanas em que pode ocorrer sepse, como diverticulite e apendicite perforada. A participação polimicrobiana na patogênese da peritonite generalizada é bem reconhecida na literatura.

Scheiermann et al, 2011, mostraram que os modelos de indução de sepse como a injeção de componentes bacterianos (LPS) e a ligadura cecal seguida de punção (LPC) induzem hipotensão arterial e acidose metabólica, ambas as quais são características-chave de sepse grave ou choque séptico, respectivamente. LPS induz hipotensão arterial mais rápida do que LPC, o que pode ser explicado pela alta quantidade de endotoxina, que induz vasoplegia imediata. O processo de induzir hipotensão arterial leva mais tempo no LPC para sepse, mas apresenta valores semelhantes após 300 min. Em nosso estudo, o tempo de avaliação da sepse não ultrapassou os 120 minutos, todavia, nossos estudos demonstraram queda nos valores de pressão sistólica, diastólica e arterial média corroborando com o quadro de hipotensão arterial. De acordo com esses mesmos autores, em contraste com LPS, LPC está associado a uma mortalidade considerável, que também é frequentemente observada na sepse.

Jung, 2019 demonstrou que a sepse é um processo fisiopatológico complexo e os possíveis mecanismos subjacentes incluem alterações da microcirculação, diminuição da produção de hemácias, anemia crônica pré-existente, hemodiluição e aumento da destruição de hemácias devido a alterações nas membranas de hemácias. No presente estudo não houve alteração nos valores de hemoglobina e hematócrito, por se tratar de um modelo de sepse aguda, com o tempo experimental de 120 minutos.

Dewitte, 2017, relatou que a formação de agregados plaquetários / leucocitários no sangue depende da ativação plaquetária e é um fenômeno precoce na progressão da sepse. Por exemplo, os complexos de plaquetas / neutrófilos são elevados nas fases iniciais, embora sejam reduzidos na sepse complicada, possivelmente refletindo sequestro periférico ou trombocitopenia associada à sepse, e a administração de endotoxina em humanos leva a um aumento dos agregados de plaquetas / neutrófilos circulantes que se segue uma breve diminuição, nossos resultados corroboram com essa afirmativa.

A acidose metabólica pode reduzir a sobrevivência de sepse por uma variedade de mecanismos. Em primeiro lugar, a acidose tem sido associada à instabilidade hemodinâmica, embora a associação nem sempre seja consistente e os mecanismos são incertos. Pedoto e colaboradores, mostraram que a acidose metabólica pode aumentar a sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), podendo causar vasodilatação e choque. 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, foi observada hipotensão arterial. 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 acarreta queda na pressão arterial também. Adicionalmente a isso, a evolução da frequência cardíaca ao longo do período experimental também corrobora com tais informações; ou seja, nota-se um aumento significativo em M3, mostrando o efeito compensatório. REGUEIRA et al. (2011) em uma revisão sistemática de 160 experimentos de estudos de sepse e lesão renal aguda encontraram que o fator determinante principal da normalidade do fluxo renal na sepse é a frequência cardíaca.

Segundo VELISSARIS et al. (2015), a acidose metabólica pode ser o resultado de um aumento primário no íon hidrogênio ( $H^+$ ) ou redução da concentração de bicarbonato. Em estados agudos de acidose metabólica, a compensação respiratória por meio da hiperventilação resulta em redução relativa da  $PaCO_2$ , enquanto nos estados crônicos o corpo humano desenvolve compensação renal por meio da reabsorção de  $HCO_3^-$ . A etiologia da acidose

metabólica é dividida em causas que resultam em hiato aniônico (AG) elevado e causas que não resultam. O bicarbonato é a principal forma de  $\text{CO}_2$  no corpo humano e pode ser estimado a partir do pH e da  $\text{pCO}_2$ . A faixa normal de pH é 7,35–7,45 e o bicarbonato normal é 21–28 mEq / L. O pH sanguíneo é reduzido (acidose) quando a quantidade de  $\text{CO}_2$  é elevada e aumenta (alcalose) quando a quantidade de  $\text{CO}_2$  é reduzida ou quando a quantidade de base, como o bicarbonato, aumenta no sangue. O bicarbonato é secretado e absorvido novamente (conservação) pelos rins em resposta às mudanças de pH e é comumente encontrado como bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ).

Foi observado que a sepse promoveu aumento da concentração plasmática de creatinina. De forma semelhante a creatinina, os níveis elevados de uréia plasmática também indicam que os animais apresentaram um considerável comprometimento da função renal. Nos estudos feitos com o modelo experimental da sepse, com aplicação de *Escherichia coli* intraperitoneal, os ratos apresentaram aumento acentuado das dosagens de ureia e creatinina cursando junto com as lesões histopatológicas (edema, hemorragia, congestão e necrose), mas permaneceram sépticos por sete dias (LIMA, 2011). Num outro estudo realizado com o mesmo modelo experimental deste trabalho, PINTO et al. (2012) descreveram um aumento não significativo nos valores de ureia e creatinina plasmáticas. No referido trabalho, classificam essa alteração como de menor risco, sem explicação para o fato. Em outro estudo realizado em 2009, DOI et al. concluíram que animais se tornaram clinicamente doentes 6 horas após a cirurgia de punção cecal, com danos renais; mas, a creatinina sérica não apresentou aumento até 12 horas após. Apesar disso, reafirmaram ser um modelo que mais se aproxima às características clínicas da sepse. A lesão endotelial na LRA induzida pela sepse favorece a formação de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), moléculas de adesão (VCAM) e as selectinas P e E, que promovem a interação leucócito-endotelial, adesão plaquetária e obstrução mecânica da microvasculatura renal. A disfunção endotelial induz a formação de citocinas pró-inflamatórias pelas células tubulares que intensificam o processo inflamatório, propiciam a apoptose principalmente das células da região tubular e a lesão oxidativa por geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Em relação ao número de plaquetas, observou-se que houve diferença estatística na avaliação no período e M3 em relação aos tempos M1. Isto é explicado por que a partir da síndrome da resposta inflamatória sistêmica e evolução para a sepse há uma infiltração de neutrófilos, aumento de permeabilidade vascular e estimulação da liberação de fibrina com formação de trombos (KNÖBL, 2002).

Como pode ser observado, houve uma estabilidade no padrão de leucócitos, ou seja, existe a grande possibilidade dos animais a partir daí, iniciarem a leucopenia, determinando o início da sepse grave. Tais resultados corroboram com relatos da literatura descrito por VANZANT et al. (2011) na fisiopatologia da sepse. Araújo Filho e colaboradores (2015) encontraram aumento significativo de neutrófilos e eosinófilos em ratos, 30 minutos após LPC com e sem pneumoperitonio. Resumidamente, na sepse ocorre a ativação de moléculas de adesão no endotélio que resulta na integração leucócitos-endotelial. Os leucócitos ativos aumentam a liberação de mediadores inflamatórios e a geração de EROs pelas células tubulares, que contribuem para progressão da lesão e falência do órgão, caracterizando o quadro de LRA induzida por sepse. Esses mecanismos mais íntimos de lesão não foram avaliados neste estudo, porém os resultados de peroxidação lipídica no grupo Sepse pressupõem que essa desorganização celular e molecular fez presente.

Espera-se que lesões estruturais do rim contribuam para a disfunção renal da LRA séptica e que a necrose tubular aguda seja responsável por essa disfunção. Entretanto, estudos de lesão renal aguda causado por sepse experimental e estudos pós-morte de sepse humana, demonstram que lesões como a necrose tubular aguda são incomuns. A esse respeito, estudos compararam a histologia de tecido renal post morte daqueles que morreram com e sem sepse. Eles encontraram mais lesões tubulares menores, infiltração de leucócitos e apoptose nos rins sépticos. Estas alterações foram apenas focais, a maioria dos néfrons pareceu normal, e os índices de disfunção renal previram mal as alterações histológicas renais (BELLOMO et. al. , 2017).

Um estudo experimental controlado, conduzido por Maiden et al (2016), de LRA séptica em ovinos monitorou simultaneamente a função renal, o fluxo

sangüíneo renal, obteve biópsias renais sequenciais por 48 horas e fez avaliação histológica sistemática. Com o desenvolvimento de insuficiência renal aguda séptica grave, o consumo de oxigênio renal e o fluxo sanguíneo renal permaneceu inalterado e a única anormalidade histológica foi a menor expansão mesangial focal na microscopia eletrônica.

Assim, concluiu-se que há uma desconexão entre função e estrutura na LRA séptica, e as mudanças precoces na função renal com sepse parecem representar primariamente uma doença funcional em vez de estrutural.

## 8. CONCLUSÃO

Após realização do presente trabalho, podemos concluir que a SEPSE provocou uma acidose metabólica e hipotensão arterial resultando em uma hipoperfusão e disfunção renal confirmada pelo aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina, e degeneração hidrópica.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANGUS DC; VAN DER POLL T. Severe Sepsis and Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v.369, n. 9, p. 840-851, 2013.

AZEVEDO, LCP; CAVALCANTI, AB; LISBOA, T; DAL PIZZOL, F; MACHADO, FR. A Sepse é um Grave Problema de Saúde na América Latina: uma chamada à ação. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 30, n.4, p. 402-404, 2018.

ADEVA-ANDANY, M. M., FERNANDEZ-FERNANDEZ, C., MOURIÑO-BAYOLO, D., CASTRO-QUINTELA, E., DOMÍNGUEZ-MONTERO, A. Severity of postpartum haemorrhage: Secondary analysis of a prospective trial. **British Journal of Anaesthesia**, v. 108, p. 984-989, 2012.

AIKEN, C. G. A. History of medical understanding and misunderstanding of acid base balance. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 7, n. 9, p. 2038, 2013.

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.

BEREND, K. Acid-base pathophysiology after 130 years: confusing, irrational and controversial. *Journal of Nephrology*, v. 26, n. 2, p. 254-65, 2013.

BONE, RC; GRODZIN, CJ; BALK, RA. Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. **Chest**, v. 112, n.1, p. 2035-2043, 1997.

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

CERRA, FB. The Systemic Septic Response: Multiple Systems Organ Failure. **Critical Care Clinics**, v. 1, n. 3, p. 591-607, 1985.

CONDE, Katia Aparecida Pessoa et al. Differences in sepsis treatment and outcomes between public and private hospitals in Brazil: a multicenter observational study. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e64790, 2013.

DOI, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P.S.T.; STAR, R. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **J Clin Invest**. 2009.

FREUDENBERG, MA; KEPPLER, D; GALANOS, C. Requirement for Lipopolysaccharide-Responsive Macrophages in Galactosamine-Induced Sensitization to Endotoxin. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 3, p. 891-895, 1986.

GATTINONI, L., PESENTI, A., MATTHAY, M. Understanding blood gas analysis. **Intensive care medicine**, v. 44, n. 1, p. 91-93, 2018.

GAIESKI, David F. et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Critical care medicine**, v. 41, n. 5, p. 1167-1174, 2013.

HOTCHKISS, RS; MONNERET, G; PAYEN, D. Sepsis-Induced Immunosuppression: from Cellular Dysfunction to Immunotherapy. **Nature**, v. 13, p. 862-874, 2013.

JANEWAY, CA. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 54, p. 1-13, 1989.

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

KIM, Y., MASSIE, L., MURATA, G. H., TZAMALOUKAST, A. H. Discrepancy between measured serum total carbon dioxide content and bicarbonate concentration calculated from arterial blood gases. **The Cureus Journal of Medical Science**, v. 7, n. 12, 2015.

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

KUMAR, V., KARON, B. S. Comparison of measured and calculated bicarbonate values. **Clinical chemistry**, v. 54, n. 9, p. 1586-1587, 2008.

LAZENBY, R. B. **Handbook of pathophysiology**. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2011.

LIVESEY, G. Energy and protein requirements the 1985 report of the 1981 Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. **Nutrition Bulletin**, v. 12, n. 3, p. 138-149, 1987.

MACHADO, F. R., CAVALCANTI, A. B., BOZZA, F. A., FERREIRA, E. M., CARRARA, F. S. A., SOUSA, J. L., CAIXETA, N., SALOMÃO, R., ANGUS, D., C., AZEVEDO, L., C., P. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017.

MARSHALL, JC. Such Stuff as Dreams Are Made On: Mediator-Directed Therapy in Sepsis. **Nature**, v. 2, p. 391-405, 2003.

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.

NASIR, N. M., STHANESHWAR, P., YUNUS, P. J., YAP, S. F. Comparing measured total carbon dioxide and calculated bicarbonate. *The Malaysian journal of pathology*, v. 32, n. 1, p. 21-26, 2010.

QUADE, B. N., PARKER, M. D., OCCHIPINTI, R. "The therapeutic of importance of acid-base balance." **Biochemical Pharmacology**, v. 183, 2021.

RAPHAEL, K. L. Metabolic acidosis in CKD: core curriculum 2019. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 74, n. 2, p. 263-275, 2019.



RELLO, J; VALENZUELA-SÁNCHEZ, F; RUIZ-RODRIGUEZ, M; MOYANO, S. Sepsis: A review of Advances in Management. **Advances in Therapy**, v. 34, p. 2393-2411, 2017.

REGUEIRA T, et al. Fisiopatología de la insuficiencia renal aguda durante la sepsis. **Med Intensiva**. v. 35, p. 424-32, 2011

SALOMÃO, R; FERREIRA, BL; SALOMÃO, MC; SANTOS SS; AZEVEDO, LCP; BRUNIALTI, MKC. Sepsis: evolving concepts and challenges. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.52, n.4, p. 1-14, 2019.

SEELEY, E. J.; MATTHAY, M. A.; WOLTERS, P. J. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 303, n. 5, p. L355-L363, 2012.

SINGER, M; DEUTSCHMAN, CF; SEYMOUR, CW; SHANKAR-HARI, M; ANNANE, D; BAUER, M; BELLOMO, R; BERNARD, GR, *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Journal of The American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

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.

VAN DER POLL, T. Host-Pathogens Interactions in Sepsis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 32-43, 2008.

VAN DER POLL, T., HERWALD, H. The coagulation system and its function in early immune defense. **Thrombosis and haemostasis**, v. 112, n. 10, p. 640-648, 2014.

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.

VINCENT, Jean-Louis et al. Sepsis definitions: time for change. **Lancet (London, England)**, v. 381, n. 9868, p. 774, 2013.

WOOTEN, E. W. Calculation of physiological acid-base parameters in multicompartiment systems with application to human blood. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 6, p. 2333-2344, 2003.

VELISSARIS, D., KARAMOUZOS, V., K TENOPOULOS, N., PIERRAKOS, C., KARANIKOLAS, M. , "The Use of Sodium Bicarbonate in the Treatment of Acidosis in Sepsis: A Literature Update on a Long Term Debate", *Critical Care Research and Practice*, v. 2015, , 7 pages, 2015.

.