



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS TRINDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Thander Jacson Nunes Calente

**Lactato sanguíneo como biomarcador de disfunção de órgãos na sepse
experimental**

Florianópolis

2023

Thander Jacson Nunes Calente

Lactato sanguíneo como biomarcador de disfunção de órgãos na sepse experimental

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

Florianópolis
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo Autor.

Calente, Thander Jacson Nunes

Lactato sanguíneo como biomarcador de disfunção de órgãos na sepse experimental / Thander Jacson Nunes Calente ; orientadora, Daniel Fernandes, 2023.

80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Sepse. 3. Disfunção orgânica . 4. Modelo experimental. I. Fernandes, Daniel. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Thander Jacson Nunes Calente

Lactato sanguíneo como biomarcador de disfunção de órgãos na sepse experimental

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof., Dr. Jose Eduardo Da Silva Santos
Farmacologia/CCB/UFSC

Prof., Dr. Geisson Marcos Nardi
Fisiologia/CCB/UFSC

Prof., Dr. Jamil Assreuy
Farmacologia/CCB/UFSC

Prof(a). Dr(a). Renata Maria Lataro
Ciências Fisiológicas/PPGMCF/UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Daniel Fernandes
Orientador

Florianópolis, 2023.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Marlene Nunes Calente e Luiz Maria Calente em gratidão ao apoio em minha trajetória acadêmica, ensinamentos e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora por me proporcionar saúde física e mental para realizar todas as minhas conquistas na vida, provando estarem sempre me guiando e protegendo.

Em especial à minha mãe Marlene e ao meu pai Luiz, irmãos, sobrinhos e cunhado que mesmo distantes estiveram presentes em toda a minha caminhada acadêmica sendo insubstituíveis em minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Daniel Fernandes, por abrir as portas de seu laboratório e me proporcionar um excelente ensinamento, sempre com intuito de incentivar meu crescimento profissional.

Ao Junior, Gabrielle, Gustavo, e Lucas meus agradecimentos, pela disponibilidade de ensinar algumas técnicas experimentais e por serem ótimos colegas no âmbito laboratorial e pessoal.

À Leticia, farmacêutica do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago-UFSC, por disponibilizar seu tempo para ajudar nas análises bioquímicas desenvolvidas em meus experimentos.

Aos meus amigos do PPGFMC, Leonardo, Stherfani, Maria Luisa, Merita, Lívia e Nicholas por me incentivarem e estarem presentes me apoiando em todos os momentos.

Agradeço ao PPGFMC e a todos os professores por proporcionarem todo o conhecimento adquirido durante a trajetória.

Agradecimento especial aos membros da banca examinadora, os professores Renata, Geisson, José e Jamil pela disponibilidade e por aceitarem participar e contribuir na avaliação deste trabalho.

Ao LAMEB, funcionários e técnicos, por se disponibilizarem a ensinar algumas técnicas utilizadas em pesquisa.

Agradeço ao órgão de fomento CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia por proporcionar qualidade de ensino em minha trajetória acadêmica.

RESUMO

A sepse é uma disfunção orgânica originada por uma resposta imune desordenada do hospedeiro frente a uma infecção e está associado ao maior risco de mortalidade. Os modelos experimentais em animais são ferramentas eficientes para avaliar e compreender a fisiopatologia e explorar novas terapias, como o modelo de ligadura e punção cecal (CLP), técnica simples e de baixo custo que reproduz a progressão da sepse humana. Entretanto, cerca de 30% dos animais com CLP não manifestam quaisquer anomalias cardiovasculares, o que requer um maior número de repetições devido à considerável variabilidade do modelo. Dessa forma, a identificação de biomarcadores que possam prever precocemente o colapso cardiovascular na sepse seria de imenso benefício para melhorar os estudos não clínicos, aprimorando os modelos experimentais e aperfeiçoando a sua aplicação clínica. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o lactato sanguíneo como marcador prognóstico de severidade em modelo experimental de sepse em ratos. Para isso, ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar 2 a 3 meses, CEUA nº 9845200921) foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: grupo falso operado (Sham), e o CLP, nos quais foram realizados os procedimentos de ligadura e perfuração do ceco. Analisamos parâmetros temperatura, glicemia, lactato e escore de severidade antes da cirurgia, seis e doze horas após CLP. Vinte e quatro horas após induzir a sepse os animais foram anestesiados para análise de parâmetros cardiovasculares. Ao final das análises hemodinâmicas, o sangue foi coletado para AST, ALT, ureia e creatinina. Além disso, tecido do pulmão, coração e rim foram coletados para quantificação da mieloperoxidase. Para estabelecer um valor de corte capaz de distinguir animais saudáveis de doentes (sépticos) para cada uma das variáveis analisadas foi utilizado a curva ROC. Por intermédio dos pontos de cortes classificamos animais como saudável ou séptico para cada parâmetro analisado. Na sequência, determinamos o nível de lactato capaz de prever as alterações experimentais ocasionadas na sepse. Ao empregar a análise da curva ROC, estabelecemos que um valor de lactato de 2,45 mmol/L pode discriminar com precisão entre um rato exibindo uma resposta vasoconstritora normal e um rato vasoplégico com 84% de precisão (AUC: 0,84, IC: 0,67-1,00). A sensibilidade, que é a capacidade de identificar os ratos verdadeiros positivos, foi de 75% (IC: 41 – 95), e a taxa de verdadeiros negativos foi de 81% (IC: 57 – 93). Os valores de corte de lactato medido no tempo de 12 e 24 horas capaz prever e diagnosticar um colapso cardiovascular, renal e hepático foi 2,65 mmol/L. Portanto, a mensuração dos níveis de lactato na sepse pode servir como um biomarcador valioso no prognóstico para disfunção sistêmica na sepse experimental.

Palavras-chave: Sepse. CLP. Bioquímicos. Hemodinâmicos. Disfunção sistêmica.

ABSTRACT

Sepsis is an organic dysfunction caused by a disordered immune response of the host to an infection and is associated with a higher risk of mortality. Experimental animal models are efficient tools for evaluating and understanding pathophysiology and exploring new therapies, such as the cecal ligation and puncture (CLP) model, a simple and low-cost technique that reproduces the progression of human sepsis. However, around 30% of animals with CLP do not manifest any cardiovascular anomalies, which requires a greater number of repetitions due to model-specific variability. Therefore, the identification of biomarkers that can early predict cardiovascular collapse in sepsis would be of enormous benefit to improving non-clinical studies, improving experimental models and improving their clinical application. Thus, the objective of the work was to evaluate blood lactate as a prognostic marker of severity in an experimental model of sepsis in rats. For this, male and female Wistar rats 2 to 3 months old, CEUA n° 9845200921) were randomly distributed into 2 groups: sham operated group (Sham), and the CLP, in which cecum ligation and perforation procedures were performed. We analyzed parameters of temperature, blood glucose, lactate and severity score before surgery, six and twelve hours after CLP. Twenty-four hours after inducing sepsis, the animals were anesthetized for analysis of cardiovascular parameters. At the end of the hemodynamic analyses, blood was collected for AST, ALT, urea and creatinine. Additionally, lung, heart and kidney tissue were collected for myeloperoxidase quantification. To establish a cutoff value capable of distinguishing healthy animals from sick (septic) animals for each of the variables analyzed, the ROC curve was used. Using cutoff points, we classify animals as healthy or septic for each parameter analyzed. Next, we determined the lactate level capable of predicting the experimental changes caused by sepsis. By employing ROC curve analysis, we established that a lactate value of 2.45 mmol/L can accurately discriminate between a rat exhibiting a normal vasoconstrictor response and a vasoplegic rat with 84% accuracy (AUC: 0.84, CI : 0.67-1.00). Sensitivity, which is the ability to identify true positive mice, was 75% (CI: 41 – 95), and the true negative rate was 81% (CI: 57 – 93). The lactate cutoff values measured at 12 and 24 hours capable of predicting and diagnosing cardiovascular, renal and hepatic collapse were 2.65 mmol/L. Therefore, measuring lactate levels in sepsis can serve as a valuable biomarker in the prognosis for systemic dysfunction in experimental sepsis.

Keywords: CLP. Biochemical parameters. Systemic dysfunction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –A produção do lactato	26
Figura 2 – Delineamento no experimental.....	32
Figura 3 – Curva ROC.....	38
Figura 4 – Curva de mortalidade dos animais Sham e CLP.....	39
Figura 5 – Mensuração do lactato, glicemia, temperatura e o escore de severidade ao longo do tempo	40
Figura 6 – Determinação dos valores de corte para os parâmetros cardiovasculares por meio da curva ROC	43
Figura 7 – Determinação de valores para os parâmetros bioquímicos por meio da curva ROC.....	45
Figura 8 – Determinação de valores para a atividade enzimática mieloperoxidase por meio da curva ROC	47
Figura 9 – Definindo um valor ideal de lactato medido em 6 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.....	50
Figura 10 – Definindo um valor ideal de lactato medido em 6 horas para prever o colapso hepático na sepse experimental	51
Figura 11 – Definindo um valor ideal de lactato medido em 6 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.....	52
Figura 12 – Definindo um valor ideal de lactato medido em 12 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.....	54
Figura 13 – Definindo um valor ideal de lactato medido em 12 horas para prever o colapso hepático na sepse experimental	55
Figura 14 – Definindo um valor ideal de lactato medido em 12 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.....	56
Figura 15 – Definindo um valor ideal de lactato medido em 24 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.....	58
Figura 16 – Definindo um valor ideal de lactato medido em 24 horas para prever o colapso hepático na sepse experimental.....	59
Figura 17 – Definindo um valor ideal de lactato medido em 24 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.....	61
Figura 18 – Valor de corte de lactato capaz de prever uma disfunção cardíaca, hepática e alta migração de neutrófilos para o tecido renal em 6 horas	66

Figura 19 – Valor de corte de lactato capaz de predizer uma disfunção cardíaca, hepática e alta migração de neutrófilos para o tecido renal em 12 horas 67

Figura 20 – Valor de corte de lactato utilizados para o diagnóstico de colapso cardíaca, hepático e alta migração de neutrófilos para o tecido renal em 24 horas 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Escore de SOFA	16
Tabela 2 –quick SOFA (qSOFA).....	17
Tabela 3 – Marcadores promissores para prognóstico da sepse.....	24
Tabela 4 – Valores de corte entre animais sépticos e saudáveis.	48
Tabela 5 – Valores ideais de lactato medido no tempo de 6 horas.....	53
Tabela 6 – Valores ideais de lactato medido no tempo de 12 horas.....	57
Tabela 7 – Valores ideais de lactato medido no tempo de 24 horas.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC: Área sob a curva

ANOVA – Análise de variância

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CLP: Ligadura e perfuração do ceco (do inglês, *cecaligationandpuncture*)

CONCEA: Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DO: Densidade Óptica

FC: Frequência cardíaca

FR: Frequência respiratória

FSR: Fluxo sanguíneo renal

ILAS: Instituto Latino Americano de Sepse

IRPM: Incursões respiratórias por minuto

MPO: Mieloperoxidase

NO – Óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)

NOx – Nitrato e nitrito

PAM: Pressão Arterial Média

PCR – Proteína C reativa

qSOFA: quick SOFA

SOFA: do inglês, SequentialOrganFailure Assessment

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

UP – Unidade de perfusão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	SEPSE: DEFINIÇÃO	15
1.2	SEPSE: EPIDEMIOLOGIA	7
1.3	SEPSE: FISIOPATOLOGIA.....	8
1.3.1	Alterações cardiovasculares.....	229
1.4	MARCADORES PROMISSORES PARA PROGNÓSTICO DA SEPSE	23
1.5	LACTATO PLASMÁTICO NA SEPSE.....	25
1.6	MODELOS EXPERIMENTAIS DE SEPSE	26
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo Geral.....	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	ANIMAIS	30
3.2	SUBSTÂNCIAS E COMPOSTOS.....	30
3.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	30
3.3.1	Indução de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	30
3.3.2	Protocolo experimental.....	31
3.3.3	Quantificação dos níveis de lactato no sangue	33
3.3.4	Quantificação dos níveis de glicemia no sangue	33
3.3.5	Mensuração da temperatura corpórea	33
3.3.6	Quantificação do escore de severidade.....	33
3.3.7	Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca (FC) in vivo, por administração em bolus de fenilefrina e angiotensina II	34
3.3.8	Avaliação do Fluxo sanguíneo renal (FSR) in vivo.....	34
3.3.9	Quantificação dos marcadores plasmáticos de danos teciduais.....	35

3.3.10	Quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO) nos tecidos coração, pulmão e rim.....	35
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
3.5	TAMANHO AMOSTRAL.....	38
4	RESULTADOS	39
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DO ÍNDICE DE MORTALIDADE EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO PROCEDIMENTO DE SEPSE INDUZIDA POR CLP	39
4.2	AVALIAÇÃO TEMPORAL DO LACTATO, GLICEMIA, TEMPERATURA E ESCORE DE SEVERIDADE	39
4.3	DEFINIÇÃO DOS VALORES DE CORTE ENTRE ANIMAIS SÉPTICOS E SAUDÁVEIS PARA OS PARÂMETROS AVALIADOS	41
4.3.1	Parâmetros cardiovasculares.....	41
4.3.2	Parâmetros bioquímicos.....	44
4.3.3	Atividade enzimática mieloperoxidase (MPO)	46
4.4	DETERMINAÇÃO DO VALOR IDEAL DE LACTATO MEDIDO NO TEMPO DE 6 HORAS PARA PREVER MUDANÇAS SISTÊMICAS NA SEPSE.....	49
4.5	DETERMINAÇÃO DO VALOR IDEAL DE LACTATO MEDIDO NO TEMPO DE 12 HORAS PARA PREVER MUDANÇAS SISTÊMICAS NA SEPSE.....	54
4.6	DETERMINAÇÃO DO VALOR IDEAL DE LACTATO MEDIDO NO TEMPO DE 24 HORAS PARA PREVER MUDANÇAS SISTÊMICAS NA SEPSE.....	58
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	ANEXO I - Curvas de dose-resposta de angiotensina II	79
	ANEXO II - Curvas de dose-resposta de fenilefrina	80

1. INTRODUÇÃO

1.1.SEPSE: DEFINIÇÃO

De acordo com o Terceiro Consenso Internacional para Definições de Sepse e Choque Séptico (*Sepsis-3*), a sepse é uma disfunção orgânica originada por uma resposta imune desordenada do hospedeiro frente a uma infecção. O distúrbio fisiológico pode desencadear alterações a nível celular em órgãos vitais, sendo umas das principais causas de morte em unidades de terapia intensiva (OPAL; WITTEBOLE, 2020; ZHAI *et al.*, 2018; SINGER *et al.*, 2016). Ainda de acordo com o último consenso, o choque séptico pode ser conhecido como um subgrupo de pacientes com sepse que apresentam acentuadas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas e associadas com maior risco de morte do que a sepse isoladamente (SHANKAR-HARI *et al.*, 2017; RUSSELL *et al.*, 2018).

Os critérios diagnósticos de choque séptico baseiam-se na presença de hipotensão e necessidade de vasopressor para manter uma pressão arterial média acima de 65 mmHg após a ineficácia da reposição volêmica (infusão adequada de fluidos) associado a níveis séricos de lactato acima de 2 mmol/L (SHANKAR-HARI *et al.*, 2017). Uma característica marcante do choque séptico e que contribui para gravidade do quadro é a refratariedade a terapia com vasoconstritores (hiporeatividade a vasoconstritores) (FERNADES *et al.*, 2021; SINGER *et al.*, 2016).

Na prática clínica o *Score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)* é utilizado no diagnóstico e monitoramento de pacientes com sepse e choque séptico. A classificação do escore baseia-se de acordo com níveis de severidade ocorridos durante a disfunção orgânica, avaliando os danos ocorridos no sistema cardiovascular, renal, pulmonar e distúrbios de coagulação (Tabela 1) (SINGER *et al.*, 2016; LAMB DEN *et al.*, 2019). A classificação dos parâmetros avaliados é atribuída de acordo com os níveis de pontuações, sendo 0 a menor pontuação (parâmetro de normalidade), e 4 a maior pontuação, indicando maior índice de mortalidade e disfunção dos órgãos de pacientes com sepse (SINGER *et al.*, 2016; LAMB DEN *et al.*, 2019)

Tabela 1: *Escore SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)*

Avaliação	Quantificação	Pontuação				
		0	1	2	3	4
Sistema Respiratório	Fração Inspirada de Oxigênio (mmHg) Pressão Parcial de Oxigênio (mmHg)	>400	<400	<300	<200 Uso de suporte ventilatório	<100 Uso de suporte ventilatório
Sistema Cardiovascular	Pressão Arterial Média (mmHg)	>70	<70	Administração Intravenosa de dopamina ou dobutamina < 5 µg/kg/min	Administração Intravenosa de dopamina 5,1 até 15 µg/kg/min Ou Epinefrina <0,1 µg/kg/min	Administração Intravenosa de dopamina >15 µg/kg/min Ou Epinefrina >0,1 µg/kg/min Ou Noraepinefrina >0,1 µg/kg/min
Sistema Nervoso Central	Escala de Coma de Glasgow (Pontuação)	15	14 - 13	12 - 10	9-6	<6
Sistema Hepático	Bilirrubina (mg/dL)	< 1,2	1,2 - 1,9	2,0 - 5,9	6,0 - 11,9	>12
Sistema Renal	Creatinina sérica (mg/dL)	<1,2	1,2 - 1,9	2,0 - 3,4	3,5 - 4,9	> 5
	Fluxometria Urinária (mL/24h)				< 500	<200
Distúrbios de Coagulação	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	>150	<150	<100	<50	<20

Fonte: Adaptado de Lambden *et al* (2019); Singer *et al* (2016). Notas: O score SOFA avalia as disfunções orgânicas ocorridas em 6 sistemas vitais por intermédio de exames laboratoriais e clínicos. As pontuações podem variar de 0 a 4, quanto maior a pontuação, mais severo, maior será o índice de mortalidade e disfunção dos órgãos de pacientes com sepse.

Contudo, existe outro sistema de classificação simplificado que é responsável por prever e avaliar o quadro evolutivo dos pacientes internados com suspeita de sepse, chamado de *quick* SOFA (qSOFA) (CECCONI *et al.*, 2018). O sistema de classificação avalia três parâmetros: Pressão arterial sistólica, frequência respiratória e os níveis de consciência, considerada como ferramenta de avaliação rápida podendo ser utilizado na triagem de pacientes com riscos de disfunção orgânica (Tabela 2) (CECCONI *et al.*, 2018; ARSANIOS *et al.*, 2017).

O qSOFA não é tão robusto quanto o Score SOFA, mas seu uso permite minimizar mau prognóstico e prever a evolução do quadro clínico (CECCONI *et al.*, 2018; SINGER *et al.*, 2016). O qSOFA apresenta parâmetros mais rápidos, práticos e de maior aplicabilidade à anamnese dos pacientes, sendo mais indicado para triagem clínica. Qualquer aumento ou diminuição dos parâmetros avaliados no qSOFA pode ser caracterizado como preditor de mau prognóstico em pacientes internados fora da UTI (tabela 2) (CECCONI *et al.*, 2018; ARSANIOS *et al.*, 2017; SINGER *et al.*, 2016).

Tabela 2: quick SOFA (qSOFA)

Parâmetros	Valor
PAS	< 100
FR (irpm)	> 22
Nível de consciência (Glasgow)	< 15

Fonte: Adaptado de Lambden *et al.* (2019); Singer *et al.* (2016). Notas: PAS: Pressão arterial sistólica. FR: Frequência respiratória. IRPM: Incursões respiratórias por minuto.

1.2. SEPSE: EPIDEMIOLOGIA

De acordo com o Sistema *Organizacional Global Sepsis Alliance*, em 2022, mundialmente, estima-se que tenham ocorrido 50 milhões de casos de pessoas hospitalizados com sepse e 11 milhões de mortes subsequente ao choque séptico, afetando principalmente recém-nascidos (menores de 1 ano) e idosos (maiores de 60 anos) (WOLFERTZ *et al.*, 2022). Em 2021 e 2020, mundialmente, estimou-se um total de 48,9 milhões de casos com sepse e 11 milhões de mortes devido ao choque séptico (CHIU & LEGRAND 2021; RUDD *et al.*, 2020). Valores epidemiológicos

foram superiores, quando comparados com os anos de 2017 até 2018, em que sua estimativa anual era de 19 milhões de casos de pacientes hospitalizados com sepse e 5 milhões de mortes subsequente ao choque séptico por ano (KEMPKER & MARTIN, 2020). O aumento de casos e mortalidades pode ser devido a infecção ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2, tendo em vista que a presença do vírus nas vias pulmonares pode facilitar os riscos de ocorrer uma disfunção orgânica (WOLFERTZ *et al.*, 2022; KOÇAK *et al.*, 2021).

No Brasil, em 2021, estimou-se 160 mil novos casos de pacientes hospitalizados com sepse e 50 mil mortes devido ao choque séptico, apresentando uma taxa de mortalidade de 47% (LINS *et al.*, 2022). Em 2020, estimou-se 119 mil novos casos com sepse e 55 mil mortes devido ao choque séptico, havendo uma taxa de mortalidade de 45,5%. Em 2019, foi encontrado uma maior mortalidade, estimando 141 mil novos casos de pacientes hospitalizados e 63 mil mortes devido o choque séptico (LINS *et al.*, 2022; LOBO *et al.*, 2019). O aumento de taxa de mortalidade nos últimos anos no Brasil pode também ser correlacionado com a pandemia de Covid-19 (WOLFERTZ *et al.*, 2022).

1.3. SEPSE: FISIOPATOLOGIA

A sepse é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica exagerada, que leva à liberação de mediadores inflamatórios e à disfunção de múltiplos órgãos (SINGER *et al.*, 2016). A inflamação é desencadeada pela ativação de células do sistema imune, como os neutrófilos, monócitos e macrófagos, que reconhecem os patógenos invasores e liberam citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do Inglês *Tumor Necrosis Factor*) (XIA *et al.*, 2019).

Estas citocinas ativam outras células do sistema imune e induzem a produção de mais mediadores inflamatórios, incluindo as prostaglandinas, leucotrienos e os radicais livres de oxigênio. Além disso, a ativação de células imunes durante a sepse também pode levar à disfunção endotelial e ao aumento da permeabilidade vascular (SALOMÃO *et al.*, 2019; POOL *et al.*, 2018).

As interações entre endotoxina bacteriana e antígenos bacterianos são mecanismos importantes na ativação das células do sistema imune e na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e TNF- α . Essas citocinas por sua vez são importantes mediadores na resposta inflamatória sistêmica observada na sepse (ARINA & SINGER, 2021). Além disso, também apresentam outras moléculas e células que estão envolvidas na resposta inflamatória sistêmica, como a proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LPS), o complexo de histocompatibilidade principal (MHC), as células Natural Killer (NK) e a enzima conversora de interleucina-1-beta (ICE) (ARINA & SINGER, 2021; GREGORIUS & BRENNER, 2023).

Os fatores desencadeantes da ativação celular e da cascata de eventos plasmáticos são principalmente os componentes da parede celular dos microorganismos, como o LTA e peptidoglicanas, derivados de bactérias gram-positivas (exotoxinas), ou o LPS, no caso de bactérias gram-negativas (endotoxinas) (NISHIBORI, 2022; GREGORIUS & BRENNER, 2023). O reconhecimento desses patógenos ocorre por meio de receptores celulares, como os PRRs e os toll like, que detectam produtos da biossíntese dos microrganismos, os PAMPs, padrões moleculares associados aos patógenos (GREGORIUS & BRENNER, 2023). Esses receptores localizados nas células da resposta imune inata, como os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células natural killer, reconhecem esses produtos dos patógenos e iniciam a resposta inflamatória, com a liberação de diversas citocinas inflamatórias, como o TNF-alfa, a IL-6 e a IL-1, que vão atuar nas células endoteliais, resultando na ativação da coagulação, extravasamento endotelial, rolamento e extravasamento de neutrófilos, que numa forma exacerbada levam à disfunção dos órgãos e à hipotensão da sepse (XIA *et al.*, 2019; ARINA & SINGER, 2021).

Mortes precoces na sepse são tipicamente devido a uma tempestade inflamatória de citocinas que conduzem ao rápido colapso cardiovascular e dano de órgãos (CHAUDHRY *et al.*, 2013). Já as mortes tardias podem ser explicadas de duas formas: a primeira é a imunossupressão sistêmica resultando em falha na eliminação da infecção primária ou no desenvolvimento de infecções secundárias; a segunda é quando a inflamação inata se torna persistente ou a imunidade inata é prejudicada (OSUCHOWSKI *et al.*, 2006). Portanto, um equilíbrio entre as respostas

inflamatórias e anti-inflamatórias é crucial para a sobrevivência do paciente (RUSSELL *et al.* 2018).

Um mecanismo que tenta controlar a resposta inflamatória e o restabelecimento da homeostase é a síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS) (POOL *et al.*, 2018). A CARS é uma resposta fisiológica de modulação da inflamação, que visa a proteção do organismo, mantendo a homeostase. Ela é caracterizada pela produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10), que inibem a produção das citocinas pró-inflamatórias (CHOUSTERMAN *et al.*, 2017).

Entretanto, um desequilíbrio entre a resposta inflamatória e a CARS pode ocorrer, resultando em uma resposta inflamatória descontrolada, disfunção orgânica e morte (CHEN *et al.*, 2023). Além disso, a imunossupressão resultante da CARS pode levar à ocorrência de infecções secundárias e morte do paciente (CHEN *et al.*, 2023).

A presença da resposta inflamatória descontrolada na sepse é capaz de acarretar colapso cardiovascular e disfunção de órgãos (ARFARAS-MELAINIS *et al.*, 2020). Por exemplo, no sistema cardiovascular, a perda da função endotelial acarreta em hipoperfusão e prejuízo de funções de tecidos e órgãos vitais e leva à diminuição da resistência vascular periférica (JONES *et al.*, 2021). No sistema hepático, a sepse pode causar a disfunção de vários processos, como a produção de proteínas, o metabolismo de lipídeos, a gliconeogênese e a excreção de bile, induzindo a produção de radicais livres de oxigênio e levando à lesão hepatocelular (WOŹNICA *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2020).

Na sepse, o sistema renal pode apresentar a perda de função devido a diminuição do fluxo sanguíneo (LANGENBERG *et al.*, 2005). O agravamento da perda funcional do sistema renal pode levar à disfunção renal aguda (DRA) (POSTON & KOYNER, 2019). A disfunção renal aguda (DRA) é definida como uma diminuição aguda na função renal, a qual pode ser mensurada pela elevação dos níveis de creatinina sérica e/ou diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) (POSTON & KOYNER, 2019). A DRA na sepse está associada à vasoconstrição renal, à disfunção endotelial e à lesão tubular aguda e leva à retenção de

metabólitos e toxinas, e perda da função renal (PEERAPORN RATANA *et al.*, 2019). Já no sistema pulmonar, a sepse leva a uma síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), processo inflamatório nos pulmões que ocasiona danos nos alvéolos, tornando-os rígidos e impedindo a troca de gases necessária para respiração adequada (VASSILIOU *et al.*, 2020).

Diante do exposto, é importante destacar que a sepse e o choque séptico são síndromes complexas e multifatoriais, que exigem um diagnóstico e tratamento precoces e eficazes (HOTCHKISS *et al.*, 2016). Entre as terapias existentes, destaca-se o uso de antibióticos para o tratamento da infecção primária, a administração de fluidos intravenosos para corrigir a hipotensão e a disfunção orgânica, e o suporte ventilatório e nutricional para pacientes gravemente enfermos (CAMPION, 2018). Além disso, novas terapias estão sendo estudadas, como a terapia celular, que envolve o uso de células imunes modificadas geneticamente para combater a infecção e a inflamação (CAMPION, 2018).

Em suma, a sepse e o choque séptico são síndromes graves que exigem uma abordagem multidisciplinar e a utilização de diversas terapias (PURCAREA & SOVAILA, 2020). O conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese dessas síndromes é fundamental para a melhoria do diagnóstico e do tratamento, bem como para o desenvolvimento de novas terapias (LELUBRE & VINCENT, 2018; GOTTS & MATTHAY, 2016).

1.3.1. Alterações cardiovasculares

O sistema cardiovascular é composto por diversos órgãos que trabalham em conjuntos para fornecer oxigênio e nutrição a todas as células do corpo humano, seu funcionamento depende de boas condições metabólicas e hemodinâmicas (JUNIOR *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006). O que comumente não ocorre na sepse e choque séptico, uma vez que a disfunção orgânica desencadeia alterações celulares, aumento do metabolismo, tempestade de citocinas e perda de função endotelial resultando uma disfunção miocárdica e hipotensão (SERGI *et al.*, 2017; JOFFRE *et al.*, 2020).

A diminuição da performance cardiovascular é um achado muito comum em pacientes internados com sepse e choque séptico e está associada a um aumento das internações e mortalidade (BEESLEY *et al.*, 2018).

A hipotensão desencadeia diversos danos ou alterações no sistema cardiovascular, uma delas é a perda da função do endotélio vascular e mal funcionamento microvascular (LELUBRE & VINCENT, 2018). O agravamento desencadeado pela resposta inflamatória sistêmica que ocasiona uma vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e aumento de leucócitos na corrente sanguínea, faz com que o sistema fisiológico tenha dificuldade de manter a pressão arterial, conseqüentemente afeta a perfusão sanguínea para os órgãos vitais (DOLMATOVA *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2021). A hipotensão no choque séptico é frequentemente acompanhada por aumento da frequência cardíaca e a redução do fluxo sanguíneo renal (DOLMATOVA *et al.*, 2021).

Os vasopressores são utilizados como uma opção de tratamento em pacientes com hipotensão arterial refratária à fluidoterapia (SCHWARZ & DEMPSEY, 2020). A utilização de protocolos para o manejo da pressão arterial na clínica pode ajudar a reduzir a mortalidade em pacientes com sepse (SRZÍĆ *et al.*, 2022).

Os riscos de morte em quadros clínicos de choques sépticos dobram quando sua hipotensão não é controlada (SHAPIRO *et al.*, 2023). A persistência da hipotensão no choque séptico pode indicar a disfunção vascular, levando um quadro de hiporresponsividade a vasopressores (FERNANDES *et al.*, 2021). Grande parte dos pacientes que apresentam falência múltipla dos órgãos em UTI não responde ao tratamento terapêutico realizado por meio de reposição volêmica e antibióticos (SATTERWHITE & LATHAM, 2020). A refratariedade à terapia com vasoconstritores é uma característica muito marcante no choque séptico e contribui para o agravamento e perda de função dos órgãos (SCHWARZ *et al.*, 2020).

O uso de vasopressores na clínica como noradrenalina, vasopressina e adrenalina apresentam seus efeitos limitados para a melhora em potencial da pressão arterial (STRATTON *et al.*, 2017). Além disso, suas dosagens são pontos discutíveis na medicina, pois podem levar a danos irreversíveis, por exemplo, doses

elevadas tendem ocasionar batimentos ectópicos, taquicardia, arritmias, parada cardíaca, acidose metabólica e necrose tecidual. Por outro lado, doses muito baixas podem não surgir efeito na melhora da hipotensão persistente e hipoperfusão tecidual (HOLMES, 2015; ANNANE *et al.*, 2018). A depressão miocárdica na sepse pode ser ocasionada por diversos fatores, incluindo alterações dentro da fibra miocárdica, edema miocárdico, liberação de várias substâncias depressoras, e conseqüentemente, uma redução no suprimento sanguíneo coronariano (PULIDO *et al.*, 2012; (WALLEY, 2018).

Os marcadores sanguíneos são comumente usados na prática médica para auxiliar no diagnóstico e avaliar a gravidade da sepse. Eles desempenham um papel significativo na identificação da condição e na monitorização da resposta ao tratamento (RUDIGER *et al.*, 2018). Além de ajudar no diagnóstico, esses marcadores sanguíneos também podem ser importantes para prever a evolução da sepse e suas possíveis complicações, especialmente as relacionadas ao sistema cardiovascular (BAKKER *et al.*, 2020).

1.4.MARCADORES PROMISSORES PARA PROGNÓSTICO DA SEPSE

As mensurações de marcadores hemodinâmicos, bioquímicos e fisiológicos são indispensáveis para a identificação, progressão e diagnóstico na sepse (VILLAR *et al.*, 2021). O aumento exacerbado de enzimas e proteínas no plasma pode ser um indicador de disfunções metabólicas, danos hepáticos, renais e cardíacos, além de sinalizar a presença de agentes biológicos anormais, processos patológicos ou resposta farmacológicas (BECHER *et al.*, 2018; CECCONI *et al.*, 2018).

O uso de marcadores bioquímicos em modelos experimentais e na clínica apresenta limitações para identificação, tratamento e diagnóstico da sepse (KIM *et al.*, 2013; ZHAI *et al.*, 2018). Uma vez que muitos marcadores não são capazes de prever a hipotensão, hiporreatividade a vasopressores ou até a morte (RAJKUMARI *et al.*, 2013; ZHAI *et al.*, 2018). Além disso, alguns exames são complexos, não apresentam praticidade, são de alto custo e demorados, dificultando a identificação da disfunção orgânica e um possível tratamento (RAJKUMARI *et al.*, 2013; KOOZI *et al.*, 2019).

Mesmo frente a divergências, existem diversos marcadores bioquímicos, fisiológicos e hemodinâmicos promissores utilizados em modelos experimentais capazes de expressar resultados fidedignos e facilitar a prognóstico na sepse (RAJKUMARI *et al.*, 2013; RUDIGER *et al.*, 2018; MAI *et al.*, 2018). Abaixo estão apresentados alguns dos possíveis marcadores mais promissores na pesquisa, capazes de expressar bons resultados no prognóstico da sepse em modelos experimentais e na clínica (Tabela 03).

Tabela 3: Marcadores promissores para prognóstico da sepse.

Estudos	Marcadores	Conclusão	Mensuração
Mai et al., 2018	Temperatura	Ambos os marcadores são eficazes para avaliar a gravidade da disfunção orgânica e prever a morte no modelo CLP em camundongos.	Fácil, rápido, baixo custo.
	MSS	A diminuição <5° C na temperatura corporal, 16 horas após os animais serem induzidos a sepse foi indicativo de mortalidade.	
Rajkumari et al., 2013	Procalcitonina (PCT)	E aumento de PCT >0,5 ng/ml em 48 horas é um preditor de sepse ocasionada por bactérias. Pacientes com níveis iniciais de PCT (> 2 ng/ml) em casos de trauma grave progrediram para a sepse.	Fácil, rápido e apresenta boa sensibilidade/especificidade.
Koozi et al., 2019	Proteína C reativa (PCR)	O aumento de PCR >100 mg/L na corrente sérica é capaz de predizer alto índice mortalidade. Apesar do marcador não ser específico, sua quantificação pode ser utilizada no prognóstico em pacientes intubados em UTI por sepse em conjunto com outros marcadores.	Fácil, simples, rápido, baixo custo.
Rudiger et al., 2018	Frequência Cardíaca (FC)	Os camundongos induzidos a sepse apresentou aumento significativo na frequência cardíaca. Os animais sépticos apresentaram nas primeiras 4 horas aumento da frequência cardíaca ≥ 50 bpm, facilitando prever a morte dos camundongos em 22 horas.	Fácil, baixo custo, grande confiabilidade.
Zhai et al., 2018	Lactato	Níveis de lactato ≥1,64mmol/L podem identificar o início da sepse em um modelo de CLP em ratos. Facilitando prever, identificar a gravidade da doença e mortalidade dos ratos.	Fácil, rápido, baixo custo e eficaz. Apresenta excelente especificidade/sensibilidade.

Fonte: Figura elaborada pelo autor (2023). Notas: Estudos que utilizaram marcadores simples, baixo custo e eficientes para avaliar a progressão da sepse e prever a disfunção orgânica e mortalidade em modelos experimentais e na clínica.

1.5. LACTATO PLASMÁTICO NA SEPSE

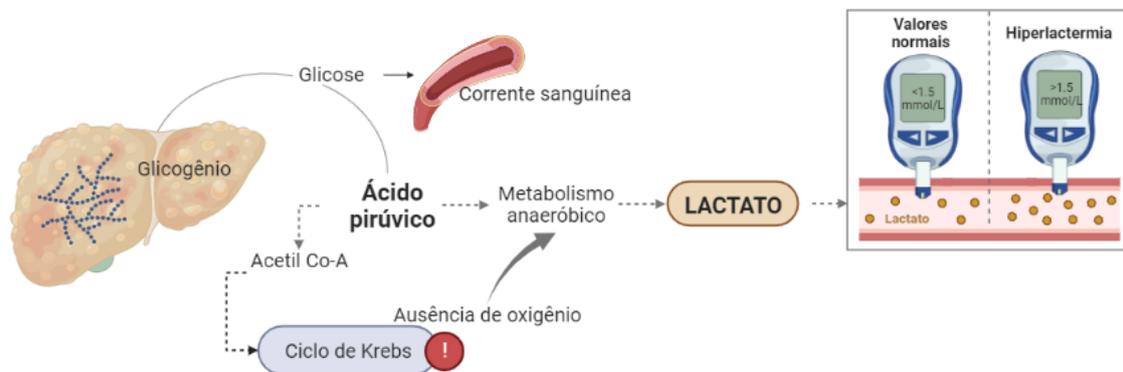
O lactato plasmático é um marcador de prognóstico e um importante indicador de hipóxia tecidual em pacientes com sepse (BAKKER *et al.*, 2020). Vários estudos têm demonstrado que a mensuração dos níveis de lactato pode ser um instrumento valioso e eficaz na avaliação da gravidade da sepse e na tomada de decisão clínica (MÉNDEZ *et al.*, 2023).

Os níveis elevados de lactato no sangue são frequentemente encontrados em pacientes com sepse, devido a uma combinação de hipoperfusão tecidual e disfunção mitocondrial (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2014; BAKKER *et al.*, 2020). A hipoperfusão tecidual resulta em uma diminuição do oxigênio disponível para as células, levando a uma produção anaeróbica de lactato, como ilustrado na figura 1 (BAKKER *et al.*, 2020). A disfunção mitocondrial contribui para o acúmulo de lactato, já que a oxidação do lactato é um importante mecanismo de regulação da concentração de lactato no organismo (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2014).

A dosagem do lactato plasmático pode ser utilizada como um indicador da eficácia da ressuscitação volêmica em pacientes com sepse (MOK *et al.*, 2021). Na clínica, existem duas estratégias eficientes e muito utilizadas na ressuscitação em pacientes com choque séptico: uma estratégia baseada nos níveis de lactato e outra baseada na perfusão periférica (ZHAI *et al.*, 2018).

O lactato plasmático é excelente indicador prognóstico, sua dosagem pode ser utilizada para monitorar a resposta ao tratamento em pacientes com sepse (NGUYEN *et al.*, 2004). As mensurações dos níveis de lactato são importantes para compreender o grau de disfunção e progressão da sepse, e sua diminuição é um ótimo indicativo de melhora da sobrevivência dos pacientes hospitalizados com choque séptico (NGUYEN *et al.*, 2004; WACHARASINT *et al.*, 2012).

Figura 1 - A produção do lactato



Fonte: Figura elaborada pelo autor (2023). Notas: Esquema sobre o processo de produção de lactato na sepse. O lactato é proveniente do metabolismo anaeróbico. O glicogênio está sempre presente e estocado no fígado, sendo convertido em glicose e liberado na corrente sanguínea quando necessário. A molécula de glicose presente na corrente sanguínea será metabolizada por hepatócitos, transformando-a em ácido pirúvico e acetil Co-A, sendo destinada ao ciclo de Krebs. Caso haja a falta de oxigenação para a molécula de glicose será destinada a uma metabolização anaeróbica, assim formando o lactato, podendo ser convertido em ácido láctico.

Os valores de lactato de inferiores ou igual 1,5 mmol/L encontrados na corrente sanguínea são considerados dentro dos padrões da normalidade. Valores acima de 2,0 mmol/L podem ser encontrados em casos de disfunção orgânica (ZHAH *et al.*, 2018; CERTO *et al.*, 2021). E valores 2,5 até 4,0 mmol/L de lactato encontrados na corrente sanguínea podem caracterizar choque séptico na clínica (WACHARASINT *et al.*, 2012). Entretanto, em modelos experimentais existem diversas lacunas, principalmente quando comparamos os valores de lactato com valores referência descritos na clínica, pois animais com sepse induzida muitas vezes podem não apresentar alterações nos valores bioquímicos e o aumento nos níveis de lactato (WACHARASINT *et al.*, 2012; CERTO *et al.*, 2021).

Em resumo, a dosagem do lactato plasmático é uma ferramenta útil na avaliação da gravidade da sepse, na tomada de decisão clínica, no monitoramento da resposta ao tratamento e na avaliação do prognóstico dos pacientes. E a dosagem dos marcadores bioquímicos em modelos experimentais é essencial para compreender as disfunções sistêmicas ocorridas na sepse (CERTO *et al.*, 2021).

1.6.MODELOS EXPERIMENTAIS DE SEPSE

Os modelos experimentais utilizando animais são ferramentas eficientes para avaliar e compreender a fisiopatologia de diversas condições clínicas. A utilização de tais modelos contribui para o prognóstico, diagnóstico e desenvolvimento de novas terapias (LIAO *et al.*, 2013). Há diversos modelos experimentais utilizados para induzir o animal ao estado séptico. No entanto, a técnica de modelo de ligadura e punção cecal (CLP) é a mais utilizada atualmente (LI *et al.*, 2018).

A ligadura e punção cecal (CLP) é uma técnica simples e de baixo custo que reproduz a progressão da sepse humana (CERTO *et al.*, 2021). Notavelmente, o perfil de citocinas observado no modelo de CLP é semelhante ao observado em pacientes, recriando as fases hemodinâmicas e metabólicas observadas na prática clínica (REMICK *et al.*, 2000). O modelo de CLP é considerado padrão de ouro na pesquisa de sepse e mimetiza uma ruptura do apêndice ou perfuração intestinal (TOSCANO *et al.*, 2011; RITTIRSCH *et al.*, 2009). A técnica envolve uma laparotomia, exteriorização do ceco, ligação e perfuração da válvula íleo-cecal. Desta maneira, este procedimento cria uma perfuração intestinal com extravazamento do conteúdo cecal no peritônio, gerando uma infecção com microbiota diversa (BURAS *et al.*, 2005).

Entretanto, o modelo de CLP apresenta uma grande variabilidade de resposta. Alguns animais são capazes de conter a infecção e não desenvolvem sepse, enquanto uma parcela desenvolve o quadro mais grave de choque séptico (LIAO *et al.*, 2013). Devido à dificuldade de se avaliar parâmetros hemodinâmicos de forma rápida e não-invasiva, usualmente não é feita uma distinção entre os animais que não desenvolveram sepse, animais sépticos ou em choque séptico (KORNEEV, 2019). Conseqüentemente, estas diferentes populações são normalmente agrupadas contribuindo para uma grande variabilidade dentro dos grupos experimentais. Esta imprecisão compromete a conclusão de muitos estudos e exige um grande número de replicatas (KORNEEV, 2019).

Marcadores como temperatura, glicemia, PCR e FC tem sido avaliado e proposto como ferramentas para identificar a gravidade e diferenciar o estado dos animais (FAIX, 2013). Entretanto, alguns deles, como a temperatura, apresentam

pouca sensibilidade ou exigem procedimentos invasivos ou ainda coletas de grande volume de sangue. Contudo, o lactato plasmático é um marcador de fácil e rápida mensuração, e uma vez que ele reflete a hipoperfusão tecidual pode estar associado ao colapso cardiovascular (FAIX, 2013; CERTO *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a hipótese desta pesquisa é que os níveis elevados de lactato plasmático em modelos experimentais de sepse em ratos estão correlacionados com o desenvolvimento de disfunções sistêmicas, cardiovasculares e hepáticas. Acredita-se que a elevação do lactato pode refletir a disfunção celular e tecidual decorrente da sepse, incluindo disfunção vascular. Sendo assim, os ratos com níveis mais elevados de lactato podem apresentar tais disfunções. Ademais, espera-se que os níveis de lactato plasmático estejam correlacionados com marcadores de disfunção de órgãos e marcadores inflamatórios durante a sepse experimental em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o lactato sanguíneo como marcador prognóstico de severidade em modelo experimental de sepse em ratos.

2.2.Objetivos Específicos

- Avaliar os níveis de lactato plasmático ao longo do tempo em um modelo de sepse experimental em ratos.
- Avaliar alterações cardiovasculares, inflamatórias e de disfunção de órgãos na sepse experimental em ratos
- Definir os valores de corte para cada parâmetro avaliado que permita distinção entre animais sépticos e não sépticos.
- Correlacionar os níveis de lactato plasmático com disfunções sistêmicas, cardiovascular e hepática ocorridas durante a sepse experimental em ratos.
- Definir os valores de lactato que possam ser utilizados como marcador de prognóstico para alterações cardiovasculares e disfunção de órgãos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar machos e fêmeas, com idade entre 2 a 3 meses. A média de peso dos machos foi de 368,8 g, com desvio padrão de 94,59, já a média de peso das fêmeas foi de 232,9 g com desvio padrão de 12,13. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e transferidos para Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia (CCB-UFSC). Três semanas antes do experimento os animais foram transferidos para o Biotério Setorial do Laboratório da Farmacologia Cardiovascular, e foram acondicionados em caixas apropriadas (mini-isoladores de polissulfona), cuja altura era de 265mm, comprimento de 497 mm e largura de 341 mm, com presença de serragem (maravalha), em estantes ventiladas (tecniplast), com temperatura controlada (22 °C), ciclo automático claro/escuro de 12 horas com luzes acesas entre 07:00 e 19:00 horas, com livre acesso à água e ração.

Os ratos foram tratados com antiparasitário (albendazol 500 mg) antecedendo 7 dias aos experimentos, para eliminação de possíveis verminoses gastrointestinais e giardíase. O tratamento foi feito durante 3 dias, utilizando 10 ml de albendazol diluído em 700 ml água de livre acesso, aguardando 7 dias após o procedimento com o antiparasitário para o início dos protocolos experimentais.

Todos os procedimentos foram realizados em âmbito laboratorial, devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o número 9845200921, seguindo as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2. SUBSTÂNCIAS E COMPOSTOS

As substâncias utilizadas neste estudo foram: albendazol (Biozen); cetamina 10% (Syntec); cloridrato de xilazina 2% (Syntec); tramadol (Retard); solução de cloreto de sódio NaCl (reposição volêmica); peróxido de hidrogênio (esterilizante); fenilefrina; angiotensina e heparina sódica (anticoagulante).

3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. Indução de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP)

O modelo experimental de sepse foi desenvolvido por Wichterman, Baue e Chaudry (1980) e adaptado para este estudo de acordo com materiais disponíveis e condições laboratoriais. Para o procedimento cirúrgico, os ratos foram pesados no biotério setorial da farmacologia cardiovascular e transferidos para o laboratório, os mesmos tratados com analgésico e anestésico. As dosagens administradas foram: 10mg/kg tramadol (analgésico), 15 mg/kg de xilazina (anestésico) e 75 mg/kg de cetamina (anestésico). Cinco minutos após a anestesia e analgesia, foi feita a tricotomia e antissepsia com álcool 70% na região abdominal. Em seguida, foi realizada uma laparotomia longitudinal na região da linha alba com a utilização de lâminas de bisturi estéril nº 10, a incisão foi de aproximadamente 1 cm. Com o auxílio de pinça de dissecação lisa o seco foi encontrado e exposto para fora da região abdominal, e foi realizado uma oclusão parcial com fio de algodão (Tex 34 Glacê) na válvula íleo-cecal. Para padronizar a espessura da oclusão na região da ligadura, foi utilizado uma haste flexível. Por fim, a perfuração do ceco foi feita de forma transfixante (agulha estéril 22G) e região do seco foi comprimida para o extravasamento do conteúdo fecal (4 mm). O ceco e o conteúdo fecal dos animais foram devolvidos para a cavidade peritoneal, e a região onde foi realizada a laparotomia foi suturada (BURAS *et al.*, 2005). Logo após esta etapa, os animais receberam reposição volêmica via subcutânea de solução fisiológica à 37° C, (50 mL/kg). Seguindo a sutura, os animais foram acomodados em manta térmica e iluminação para recuperação. Após o procedimento cirúrgico, os ratos receberam por meio de via subcutânea doses de tramadol (5mg/kg) a cada 12 horas. Para os animais do grupo Sham (falso-operados), foi seguido o protocolo descrito anteriormente, no qual foi dispensada a realização da externalização, ligadura, perfuração e extravasamento do ceco.

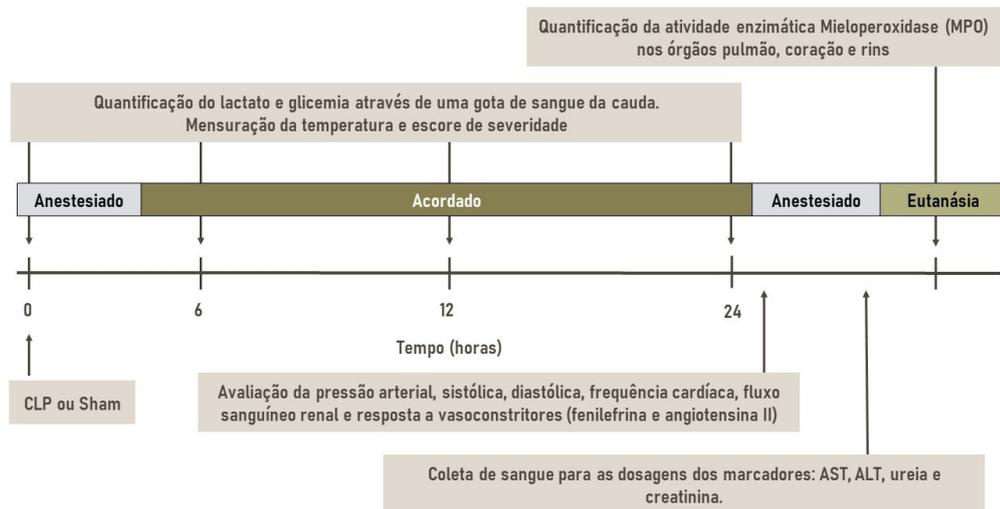
3.3.2. Protocolo experimental

Em um primeiro protocolo, 12 ratos machos foram submetidos ao procedimento de CLP conforme descrito acima e a sobrevivência foi registrada a cada 12 horas durante o período de 4 dias. Um grupo de 6 ratos machos foi usado como controle.

Os vinte e quatro ratos, sendo 12 machos e 12 fêmeas foram randomizados em 2 grupos de 12 animais cada. Foi realizada uma randomização estratificada para garantir seis machos e seis fêmeas em cada grupo. O primeiro grupo, denominado grupo séptico, foi submetido ao procedimento de CLP, enquanto o segundo grupo, chamado de grupo Sham, foi submetido à falsa cirurgia.

Imediatamente antes de iniciar procedimento de CLP foi avaliado o escore de severidade e a temperatura e foi feita a dosagem de lactato e glicose por meio da coleta de uma gota de sangue da cauda dos animais (tempo 0). Esses mesmos parâmetros foram medidos nos tempos de 6, 12 e 24 horas após o procedimento de CLP ou falsa cirurgia (Sham). No tempo de 24 horas, logo após as avaliações dos parâmetros citados acima, os animais foram anestesiados para realização do procedimento de análise de pressão arterial e fluxo sanguíneo renal. Ao final da avaliação dos parâmetros cardiovasculares foi feita a coleta do sangue, pelo cateter inserido na artéria carótida, e usado para análise da pressão arterial. Após a coleta do sangue para quantificação plasmática, os animais foram eutanasiados e os tecidos (coração, pulmão e rim) coletados (Figura 2).

Figura 2: Delineamento no experimental



Fonte: O Autor (2022). Os animais foram randomizados para serem submetidos ao procedimento de indução de sepse (CLP) ou falso procedimento (Sham). Imediatamente antes (tempo 0) e nos tempos de 6, 12 e 24 horas após os procedimentos foi avaliado o escore de severidade, os níveis de lactato sanguíneo, a glicemia e a temperatura corporal. No tempo de 24 h os animais foram anestesiados para análise de parâmetros hemodinâmicos e para coleta do plasma. O tecido foi coletado após a eutanásia dos animais.

3.3.3. Quantificação dos níveis de lactato no sangue

O lactato sanguíneo foi mensurado com os animais acordados por meio do aparelho Accutrend Plus® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), por meio de uma gota de sangue obtida na extremidade da região caudal por meio de um pequeno corte (transversal, aproximadamente 2mm) (ZOU et al., 2017). Os valores de lactato foram expressos em mmol/L e sua leitura foi contabilizada em 60 segundos no display do aparelho.

3.3.4. Quantificação dos níveis de glicemia no sangue

O índice glicêmico foi mensurado com os animais acordados por meio do aparelho kit Accu-C,hek® Active (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), por meio de uma gota de sangue - também obtida pela extremidade caudal (ZOU et al., 2017). O aparelho expressou resultados glicêmicos em mg/dL e sua leitura foi contabilizada em 5 segundos no display do aparelho.

3.3.5. Mensuração da temperatura corpórea

A avaliação da temperatura nos roedores foi mensurada na região auricular por meio de um termômetro digital G-TECH. O aparelho expressou resultados em grau Celsius (°C).

3.3.6. Quantificação do escore de severidade

O escore murino de sepse (MSS) é um sistema de pontuação capaz de prever a evolução das manifestações clínicas e mortalidade na sepse em modelos experimentais. Neste sistema de pontuação foram avaliadas variáveis como: Aparência: presença de piloereção; Nível de consciência: ausência de movimentação e presença de tremor; Atividade motora: capacidade de se alimentar, escalar ou correr; Resposta ao estímulo: auditivo ou toque; Olhos: presença de secreções; Qualidade da respiração: períodos prolongados de respiração e dificuldade ao respirar e presença de secreção nas vias nasais.

Cada variável avaliada apresenta pontuação de 1 a 4. O aumento da pontuação indica progressão da doença. Como exemplo: A pontuação 1 indica que o animal está saudável e a pontuação 4 expressa presença de manifestações clínicas e risco de mortalidade. Por meio da quantificação dos parâmetros é possível diferenciar animais saudáveis de sépticos (SHRUM & ANANTHA, 2014).

3.3.7. Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca (FC) *in vivo*, por administração em bolus de fenilefrina e angiotensina II

Vinte e quatro horas após a indução da sepse (CLP) ou falso procedimento os animais foram anestesiados via intramuscular com cetamina (75mg/kg) e xilazina (15mg/kg) e suplementados com a mesma solução em intervalos de quarenta e cinco minutos se necessário. Os mesmos foram posicionados sobre a manta cirúrgica aquecida (37°C) em posição dorsal. Uma vez posicionados, foi necessário localizar a veia femoral e artéria carótida esquerda com auxílio de uma pinça curvada e, para interromper o fluxo sanguíneo, foi utilizado uma pinça anatômica sem dente. Rapidamente após o interrompimento do fluxo sanguíneo, se fez necessário um corte na artéria onde foi acoplado um cateter de polietileno (devidamente heparinizado), amarrado e acoplado ao transdutor (PowerLab 8/30, AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) responsável por mensurar a pressão arterial (mmHg) sistólica, diastólica e frequência cardíaca (bpm).

Os valores registrados foram quantificados por um software de análises de dados fisiológicos (LabChart 8) após a estabilização da pressão arterial. Com os valores estabilizados, foi avaliada a resposta pressórica para fenilefrina (Anexo I) nas doses de 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 nmol/kg e para angiotensina II (Anexo II) nas doses de 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 pmol/kg por meio do cateter colocado na veia femoral.

3.3.8. Avaliação do Fluxo sanguíneo renal (FSR) *in vivo*

A avaliação do fluxo sanguíneo renal foi desenvolvida paralelamente com a avaliação da pressão arterial. Inicialmente, fez-se necessário a tricotomia da região peritoneal esquerda do animal e assepsia (iodo 0,1% e álcool etílico 50%),

laparotomia no flanco esquerdo com uma lâmina de bisturi n°10 e exposição para visualização do rim com auxílio de pinça curvada. Com a visualização do rim esquerdo, inserimos em sua superfície um transdutor (Laser Doppler) responsável por monitorar o fluxo sanguíneo renal. O transdutor foi conectado ao dispositivo de quantificação dos dados PoweLab® e registrado no labchart.

Após o procedimento cirúrgico a região exposta foi coberta com o auxílio de uma gaze contendo solução salina. Após o período de estabilização, o valor de fluxo sanguíneo renal foi mensurado e expresso em unidade de perfusão (UP).

3.3.9. Quantificação dos marcadores plasmáticos de danos teciduais

O sangue foi coletado pelo cateter e inserido na artéria carótida, mesma via utilizada na mensuração da pressão arterial, a fim de concluir o procedimento de análise da pressão arterial e do fluxo sanguíneo renal. As amostras foram coletadas em um tubo microtubode 1,5 ml contendo 5 UI/mL de heparina, acondicionada em gelo e centrifugada à 1.500 RPM por 10 minutos à 4°C. (FENG *et al.*, 2015). O plasma foi pipetado em microtubo de 0,5 ml e levado ao laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Catarina. Já no hospital as amostras foram novamente centrifugadas e foram dosadas no sistema integrado de bioquímica Dimension® RxL Max® (kit comercial Siemens).

Foram quantificados os níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (em U/mL), alanina aminotransferase (em U/mL), creatinina (em mg/dL) ureia (mg/dL).

3.3.10. Quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO) nos tecidos coração, pulmão e rim

Após análise dos parâmetros cardiovasculares (Pressão arterial média e frequência cardíaca) os animais foram mortos e foi realizada a abertura da caixa torácica e perfusão dos órgãos utilizando de salina, por meio da inserção de uma agulha no ventrículo esquerdo do animal e um corte na veia cava superior. Este procedimento é realizado para retirar resíduos de sangue presente nos órgãos e sistema circulatório. Assim, coletamos parte superior do coração (corte transversal), parte do pulmão esquerdo (corte transversal) e parte do rim (corte transversal) para

análise da atividade da MPO. A MPO é um marcador indireto da presença de neutrófilos, sendo responsável por sinalizar processos inflamatórios agudos e recrutar essas células em tecidos cardíacos, renais, pulmonares e hepáticos. Os tecidos, mantidos em gelo, foram pesados (aproximadamente 200 mg) e homogeneizados em solução de tampão de fosfato 20 mM contendo 1mL (pH 7,4). Após, os tecidos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 graus, os sobrenadantes foram descartados restando somente os pellets. Com isso, suspendemos os pellets utilizando 1 ml de solução de tampão de fosfato 50 mM (pH 6,0) e brometo de hexadeciltrimetilamônio à 5%. Na presente etapa, incubamos as amostras de tecido renal por 2 horas a 60°C, para eliminar excesso peroxidases interferentes presentes no tecido (SCHIERWAGEN *et al.*, 1990).

Posteriormente ao processo de incubação, as amostras foram novamente centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos em 4°C para obtenção do sobrenadante, utilizado para quantificação da atividade da enzima MPO. Em uma placa de 96 poços foi pipetado 30 µL dos sobrenadantes das amostras, 50 µL de tetrametibenzadina e 180 µL peróxido de hidrogênio para a reação enzimática, cuja concentração final de TMB H₂O₂ foi de 230µL. Imediatamente, a placa contendo as amostras foi levada a uma leitora (MultileitoraInfinite M200, Tecan, Suíça) e incubada por 10 minutos a 37°C. Os valores de absorbância foram expressos a cada 2 minutos em 650 nm em unidades de densidade óptica (O.D.). Os valores de absorbância em O.D. foram obtidos no tempo de 4 minutos. A totalidade de proteína obtida nas amostras foi mensurada pelo método de ácido bicinconíico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985). Os valores obtidos foram apresentados na forma de unidades de densidade óptica D.O./mg de proteína.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de sobrevivência foi expressa como porcentagem de mortalidade ao longo do tempo (Figura 4). Os dados dos níveis de lactato, glicemia, temperatura e escore de severidade (Figura 5) no tempo 0, 6, 12 e 24 foram expressos como média ± desvio padrão (DP) de 12 animais. Os demais dados avaliados foram expressos como gráficos de pontos além da média ± DP. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade e homogeneidade das variâncias das amostras.

Os níveis de lactato, glicemia, temperatura (variáveis quantitativas) ao longo do tempo (Figura 5) foram analisados por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido pelo teste post hoc de Tukey. A análise do escore de gravidade (variável qualitativa) foi analisada pelo teste de Friedman, seguido do teste post hoc de Dunn (Figura 5).

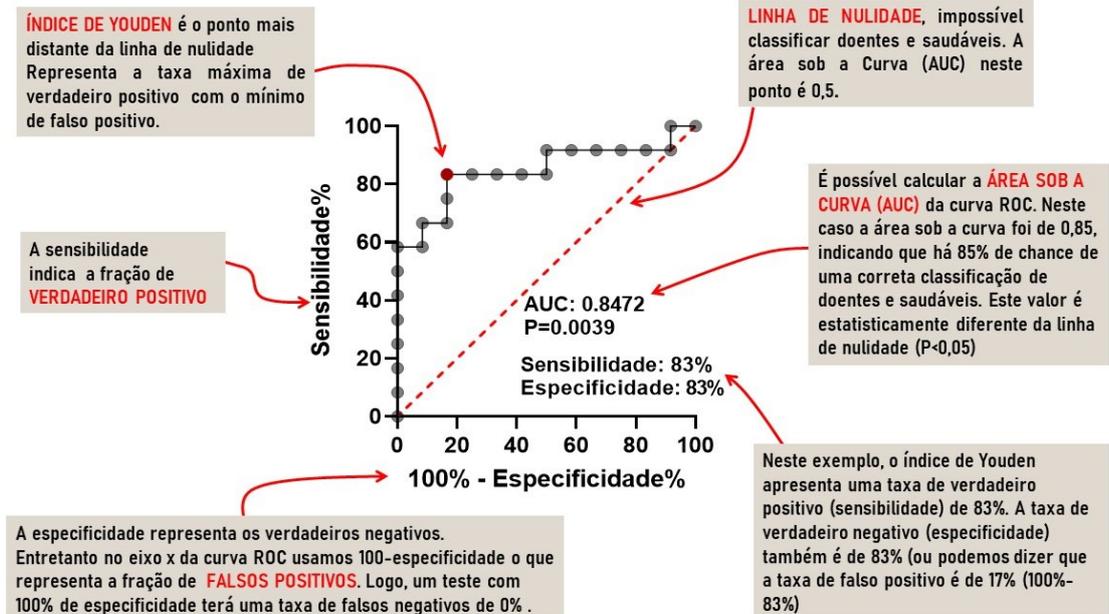
As curvas de dose-resposta para angiotensina II (Anexo I) e para fenilefrina (Anexo II) foram analisadas por ANOVA duas vias, seguido pelo teste post hoc de Sidak. Lactato, ureia (Figura 7) e MPO do rim e pulmão (Figura 8) foram realizadas usando o teste t de Student não pareado. Creatinina, AST, ALT (Figura 7), a resposta para fenilefrina (100 nmol/kg) e MPO do coração (Figura 8) foram analisados por Mann-Whitney, uma vez que não houve homogeneidade de variância entre os grupos.

Para estabelecer um valor de corte capaz de distinguir animais saudáveis de doentes (sépticos) para cada uma das variáveis analisadas foi utilizado a curva ROC. Por intermédio dos pontos de cortes transformamos os valores de variáveis contínuas em variáveis nominais, classificando os animais em grupos saudáveis e sépticos. Os pontos de corte foram determinados pelo índice de Youden (J), que é definido como a distância vertical máxima entre a curva ROC e linha diagonal (linha pontilhada que aparece nos gráficos) também conhecida como linha do acaso. O índice de Youden é calculado como sensibilidade (100%) + especificidade (100%) em porcentagem (SCHISTERMAN *et al.*, 2005).

Na sequência, as curvas ROC foram realizadas e a área sob a curva (AUC) determinada, para assim avaliar se os níveis de lactato são capazes de prever as alterações experimentais ocasionadas na sepse. A área sob a curva (AUC) indica níveis de discriminação para distinguir os grupos (Figura 3). Uma área sob a curva com o valor de 0,5 indica ausência de distinção entre os grupos de indivíduos saudáveis e doentes. Valores de 0,7 a 0,8 são classificados como "aceitável". Valor de área sob a curva entre 0,8 e 0,9 é considerado como uma discriminação "notável". Valores de AUC acima de 0,9 são considerados excepcionais para a capacidade de distinguir entre os grupos (Mandrekar, 2010).

Para análises estatísticas e elaboração destes gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 9.0 ou Jamovi 2.2.5.

Figura 3: Curva ROC.



Fonte: Figura elaborada pelo autor (2023). Notas: Modelo de uma curva ROC, exemplificando suas funções e aplicabilidade.

3.5. TAMANHO AMOSTRAL

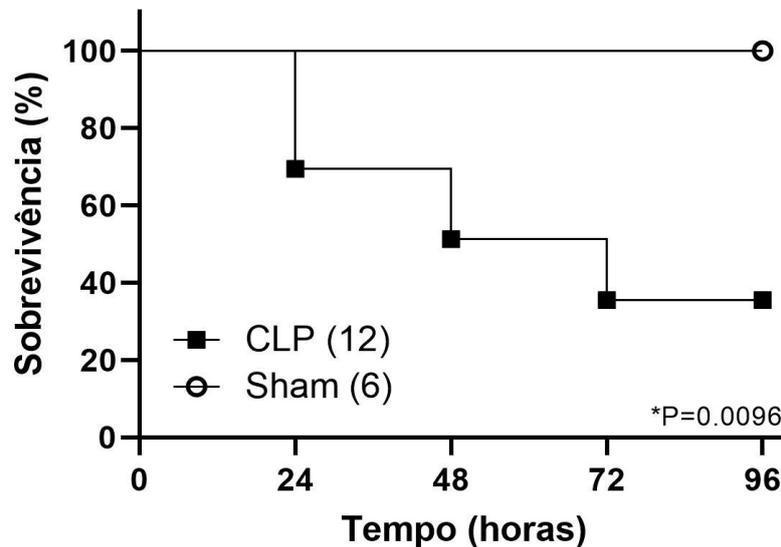
O cálculo do tamanho da amostra foi baseado na AUC da curva ROC. Consideramos um estudo diagnóstico para determinar se o lactato, variável quantitativa contínua, pode discriminar animais saudáveis de animais doentes. A hipótese nula adotada pressupõe que a AUC seja igual a 0,5, o que, na representação da curva ROC, indica a ausência de efeito. Em contrapartida, a hipótese alternativa postula que a AUC seja igual a 0,8 ou superior. Para alcançar um poder de 80% e considerando um erro Tipo I de 5% (bilateral), são necessários 12 animais controles (Sham) e 12 animais CLP. O tamanho da amostra necessário foi determinado usando o software MedCalc®.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ÍNDICE DE MORTALIDADE EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO PROCEDIMENTO DE SEPESE INDUZIDA POR CLP

A figura 4 mostra o gráfico de sobrevivência dos ratos falsos operados (Sham) e submetidos ao procedimento de CLP. Não houve mortalidade no grupo Sham. Em contrapartida, o grupo CLP apresentou uma taxa de mortalidade de 31% em 24 horas, 49% em 48 horas e 65% após 72 horas. Não houve mortalidade a partir de 72h.

Figura 4: Curva de mortalidade dos animais Sham e CLP.

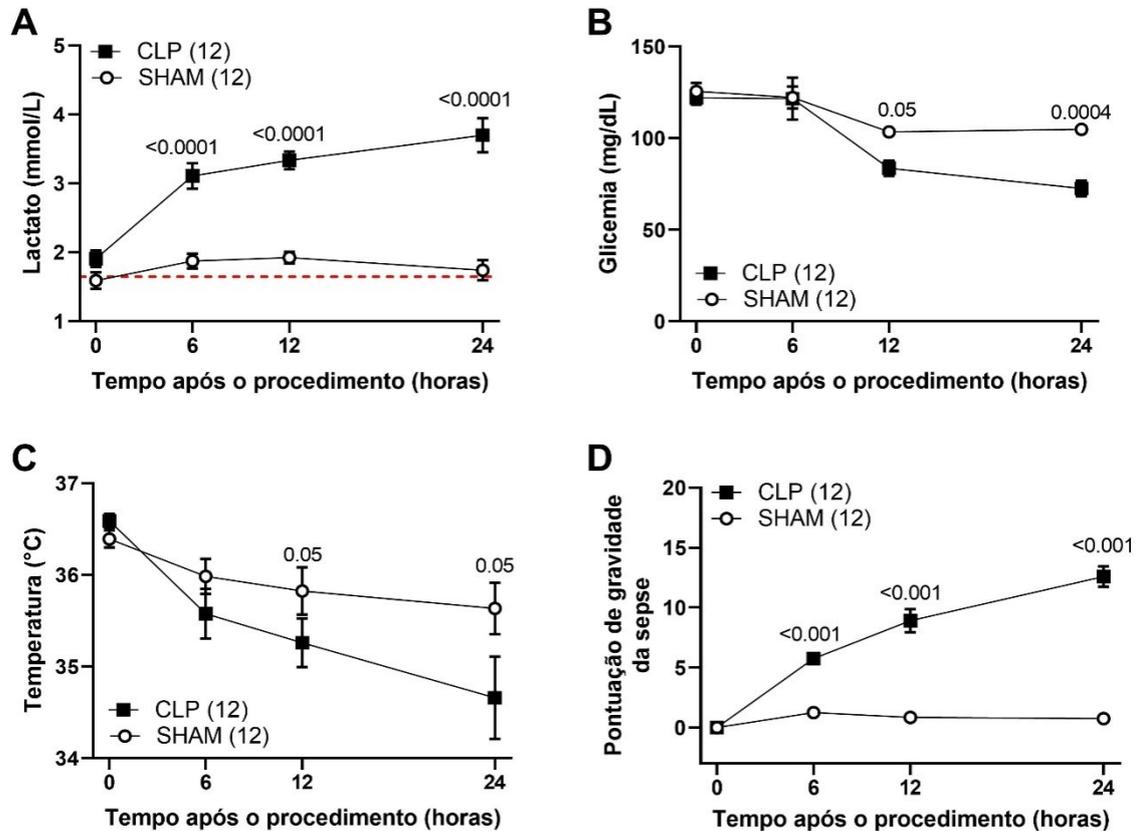


Fonte: Figura elaborada pelo autor (2023). Notas: Os ratos foram randomizados para serem submetidos ao procedimento de CLP ou falsa cirurgia (Sham) conforme está indicado na legenda. A sobrevivência foi avaliada ao longo de 4 dias. * $p < 0,05$ em relação ao Sham, comparados pelo teste Mantel-Haenszel.

4.2. AVALIAÇÃO TEMPORAL DO LACTATO, GLICEMIA, TEMPERATURA E ESCORE DE SEVERIDADE

Os animais também tiveram os níveis de lactato, glicemia e temperatura mensurados ao longo de tempo.

Figura 5: Mensuração do lactato, glicemia, temperatura e o escore de severidade ao longo do tempo.



As análises foram realizadas imediatamente antes da anestesia para o procedimento (tempo 0) e nos tempos de 6, 12 e 24 horas após os procedimentos de Sham ou CLP. Foram analisados (A) lactato, (B) glicemia, (C) temperatura e (D) escore de gravidade. Os dados são expressos como a média \pm DP de 12 ratos por grupo (6 machos e 6 fêmeas). Os valores de lactato, glicemia e temperatura (variável quantitativa) foram analisados por meio da ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste post hoc de Tukey e a análise do escore de gravidade (variável qualitativa) foram analisadas pelo teste de Friedman, seguido do teste post hoc de Dunn. Os valores de p menores que 0,05 entre o grupo entre o grupo Sham e CLP estão expressos em seus respectivos tempos. A linha pontilhada vermelha no painel A, indica valor de referencial de lactato para ratos.

O procedimento de CLP gerou o aumento nos níveis de lactato no tempo de 6 horas e os valores permaneceram elevados até o tempo de 24 horas (Figura 5A). O nível de lactato de animais Sham não alterou ao longo do tempo, permanecendo próximo dos valores de referência (indicada pela linha pontilhada vermelha na figura 5A). Embora tenha ocorrido uma leve redução nos níveis de glicemia e temperatura

dos animais Sham ao longo do tempo, não houve diferença estatística em relação ao tempo 0 (Figura 5A e B). Por outro lado, os animais CLP apresentaram uma redução significativa nos níveis glicêmicos (Figura 5B) e na temperatura (Figura 5C) no tempo de 24 horas quando comparados com o grupo Sham. Não houve diferença estatística entre o grupo Sham e CLP nos demais tempos para estes dois parâmetros.

O escore de sepse de murino (MSS) avalia a gravidade e variáveis de sepse em um modelo experimental (SHRUM et al., 2014). A avaliação quantifica a presença de piloereção, diminuição da atividade motora, presença de secreção nos olhos, perda da respiração, nível de consciência e resposta ao estímulo dos animais induzidos à sepse (SHRUM et al., 2014). O procedimento de CLP gerou um aumento progressivo no escore de severidade (Figura 5D), enquanto os animais Sham não apresentaram variação ao longo do tempo.

4.3. DEFINIÇÃO DOS VALORES DE CORTE ENTRE ANIMAIS SÉPTICOS E SAUDÁVEIS PARA OS PARÂMETROS AVALIADOS

4.3.1. Parâmetros cardiovasculares

Como pode ser observado na figura 6, no tempo de 24 horas após o procedimento de CLP houve uma redução na pressão arterial média (Figura 6A), no fluxo sanguíneo renal (Figura 6C) e na resposta vasopressora para fenilefrina (Figura 6D) e angiotensina II (Figura 6E). Não houve alteração no valor de frequência cardíaca e temperatura (Figura 6B).

Foram realizadas curvas dose-resposta de fenilefrina e angiotensina II. Quando foi realizada a comparação entre as curvas dose-resposta de fenilefrina por ANOVA de duas vias foi revelado um efeito significativo para variável procedimento (Sham versus CLP, $p=0,002$), para dose ($p<0,0001$) e uma interação entre esses fatores ($p=0,009$), sugerindo que a capacidade do CLP de diminuir a resposta à fenilefrina e angiotensina II é dependente da dose. Portanto, escolhemos a dose com a maior diferença entre as médias como resultado representativo para nossas análises (100 nmol/kg para fenilefrina e 30 pmol/kg para angiotensina II)

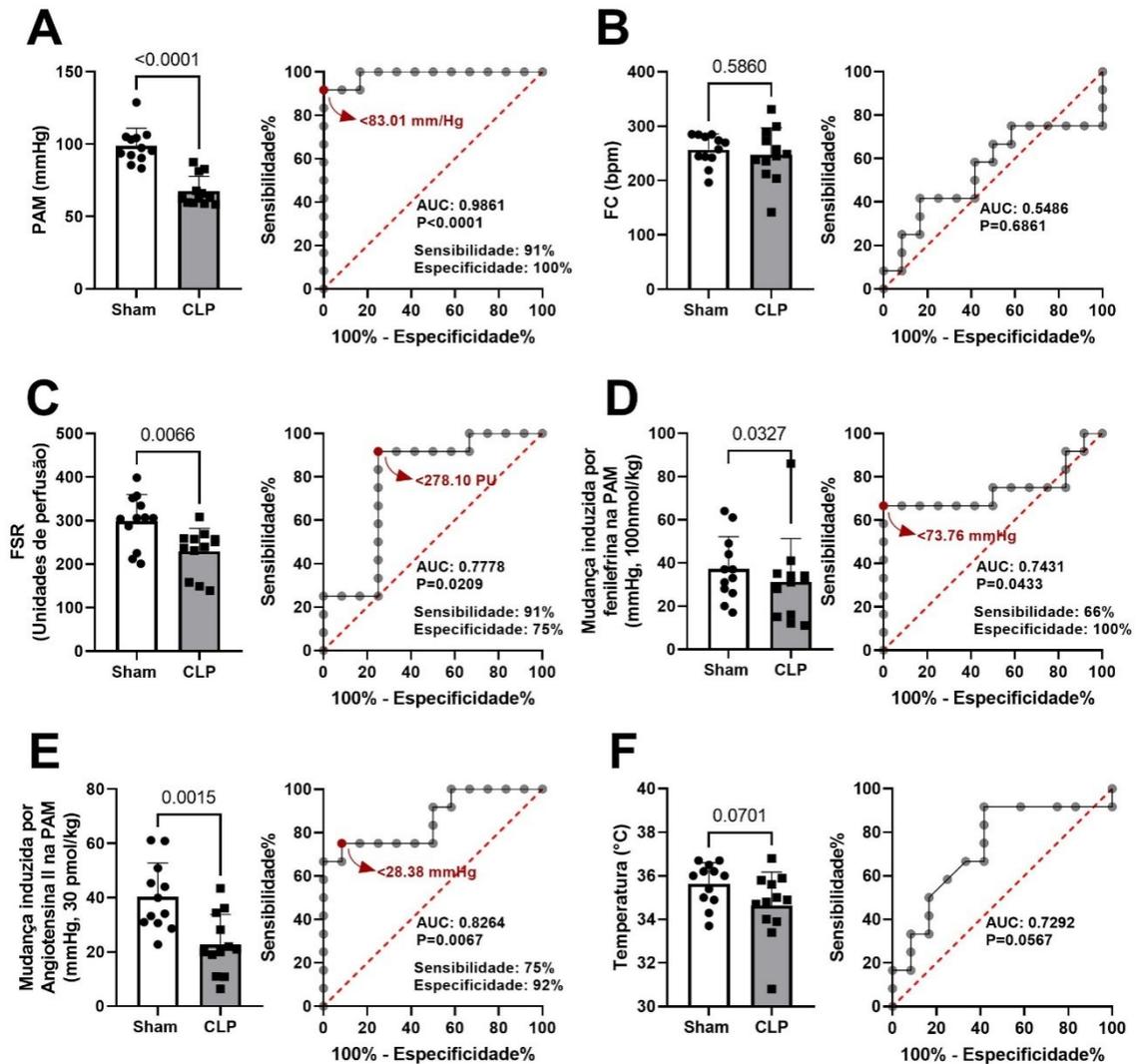
descritos no anexo I e II. São as respostas para as doses escolhidas que são representadas nas figuras e usadas nas análises.

Na sequência, foram realizadas curvas ROC para determinar os valores de corte dos parâmetros cardiovasculares que podem ser usados para distinguir animais saudáveis de animais sépticos. Usamos o método do índice de Youden (J), que define o ponto de corte ideal pela diferença entre a taxa de verdadeiros positivos e a taxa de falsos positivos sobre todos os possíveis valores de ponto de corte (SCHISTERMAN et al., 2005).

Para os valores de pressão arterial média, por exemplo, o valor de corte (Índice de Youden) foi de 83,01 mmHg. Desta forma, os animais com valores abaixo deste índice são considerados doentes (ou sépticos), enquanto os animais acima deste valor são considerados saudáveis. A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) foi 92%, portanto este ponto de corte classifica corretamente 92% dos indivíduos doentes. A especificidade (verdadeiro negativo) foi de 100%, logo a taxa de falso positivo (100-especificidade) foi de 0%, assim todos os indivíduos saudáveis são corretamente classificados. A área calculada sob a curva (AUC) para pressão arterial média foi de 0,98. A AUC é um resumo geral da precisão diagnóstica e sugere uma chance de 98% de distinguir corretamente um animal saudável e normotenso de um animal séptico com hipotensão usando este valor de corte. Os valores referentes à análise da curva ROC com os valores de corte para fluxo sanguíneo renal e resposta vasopressora para fenilefrina e angiotensina II são mostrados na figura 6 e tabela 4.

Não houve diferença estatística entre os grupos Sham e CLP tanto para frequência cardíaca (Figura 6B) como para temperatura (Figura 6F), impossibilitando a definição de valores de corte para estes parâmetros. Como pode ser observada na figura 6, a curva ROC para estes parâmetros não é estatisticamente diferente ($P > 0,05$) da linha de nulidade (linha vermelha tracejada).

Figura 6: Determinação dos valores de corte para os parâmetros cardiovasculares por meio da curva ROC



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Vinte e quatro horas após CLP ou falso procedimento, os animais foram preparados para registro da pressão arterial média (A), frequência cardíaca (B) e fluxo sanguíneo renal (C). Além disso, 100 nmol/kg de fenilefrina (D) e 30 pmol/kg de angiotensina II foram injetados (i.v.) e as alterações no MAP foram registradas. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos, sendo que cada ponto representa um animal, além da média \pm DP de 12 ratos por grupo (6 machos e 6 fêmeas). As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste t não pareado, exceto para a resposta à fenilefrina que apresentou variância desigual e foi analisada pelo teste de Mann-Whitney. O valor do ponto de corte para cada variável foi definido pelas curvas ROC por meio do Índice de Youden (indicado pelas

setas). Os valores da área sob a curva (AUC), sensibilidade e especificidade também são mostradas dentro dos gráficos das curvas ROC.

4.3.2. Parâmetros bioquímicos

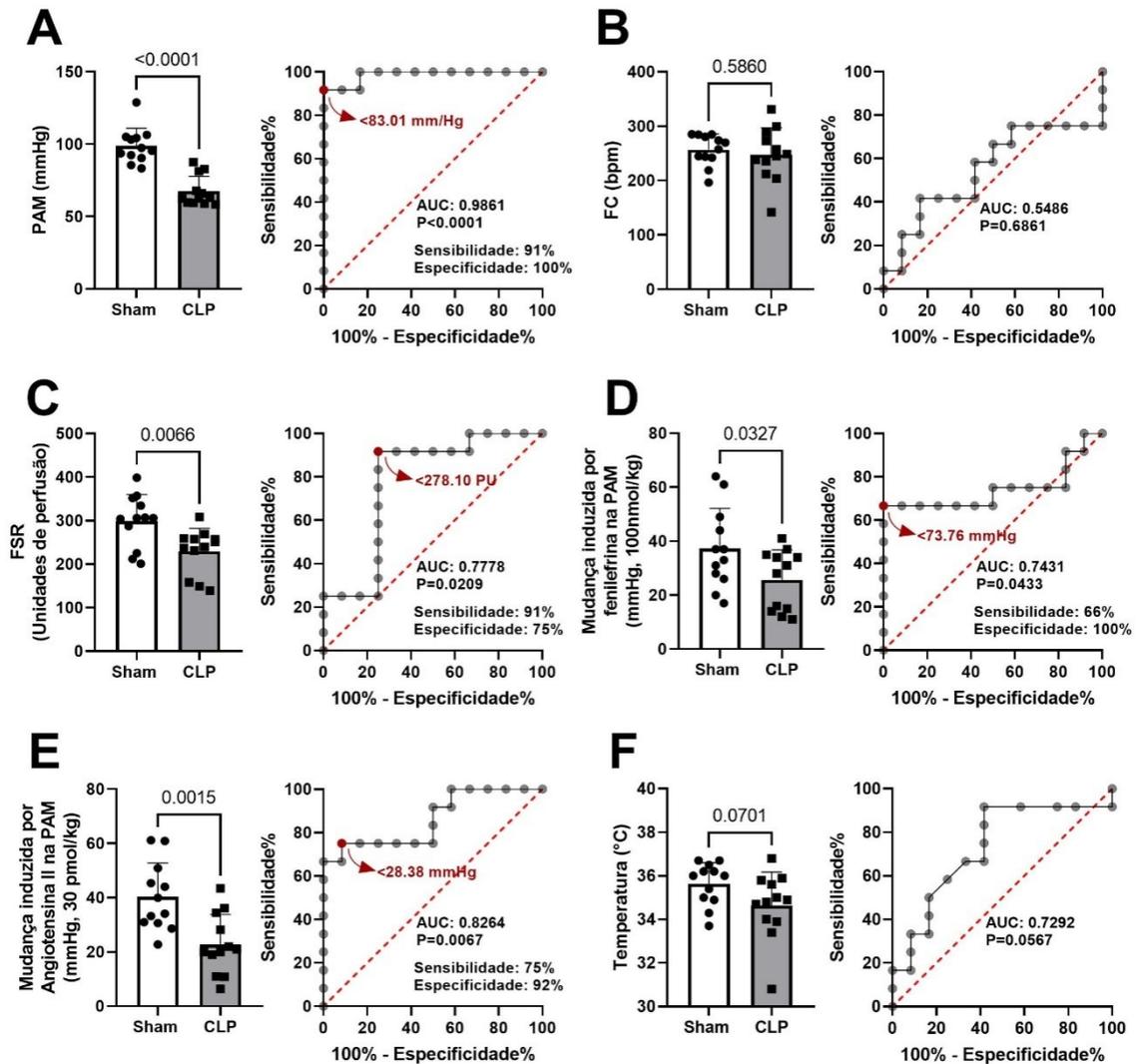
Os resultados apresentados na Figura 7 demonstram que 24 horas após o procedimento de CLP houve o aumento dos valores creatinina (Figura 7B), AST (Figura 7C), ALT (Figura 7D) e lactato (Figura 7F). Também houve a diminuição dos valores de glicemia (Figura 7E). Não houve o aumento nos níveis de ureia, quando comparado Sham e CLP. (Figura 7A).

Os valores de lactato geram uma curva ROC ideal, ou seja, os valores estão o máximo possível para cima e a esquerda (Figura 7F), proporcionando um valor de corte (Índice de Youden) o mais distante possível da linha de nulidade. O valor de corte foi de 2,65 mmol/L. Desta forma, os animais com valores abaixo deste índice são considerados saudáveis e acima deste valor são doentes (ou sépticos). Com uma curva ROC ideal temos uma sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) e especificidade (verdadeiro negativo) de 100%. Portanto, este ponto de corte classifica corretamente 100% dos indivíduos doentes sem incluir nenhum indivíduo saudável. Em uma curva ROC ideal, a área calculada sob a curva (AUC) é máxima (1,00), portanto, precisão diagnóstica do lactato é de 100% para distinguir corretamente um animal séptico e não séptico.

Interessantemente os valores de AST também proporcionaram uma curva ROC perto do ideal (Figura 7C). De forma semelhante, os valores de glicemia proporcionaram uma curva próxima da ideal (Figura 7E). Os valores de creatinina e ALT, embora tenham apresentado desempenho inferior, apresentaram curva ROC estatisticamente significativa (Figura 7B, D). Os valores referentes à análise da curva ROC para estes e demais parâmetros bioquímicos são mostrados detalhadamente na tabela 4.

Não houve diferença estatística entre os grupos Sham e CLP nos valores de ureia (Figura 7A), impossibilitando a definição de valores de corte para este parâmetro. Como pode ser observada na figura 6A, a curva ROC para este parâmetro não é estatisticamente diferente ($p=0.0885$).

Figura 7: Determinação de valores para os parâmetros bioquímicos por meio da curva ROC



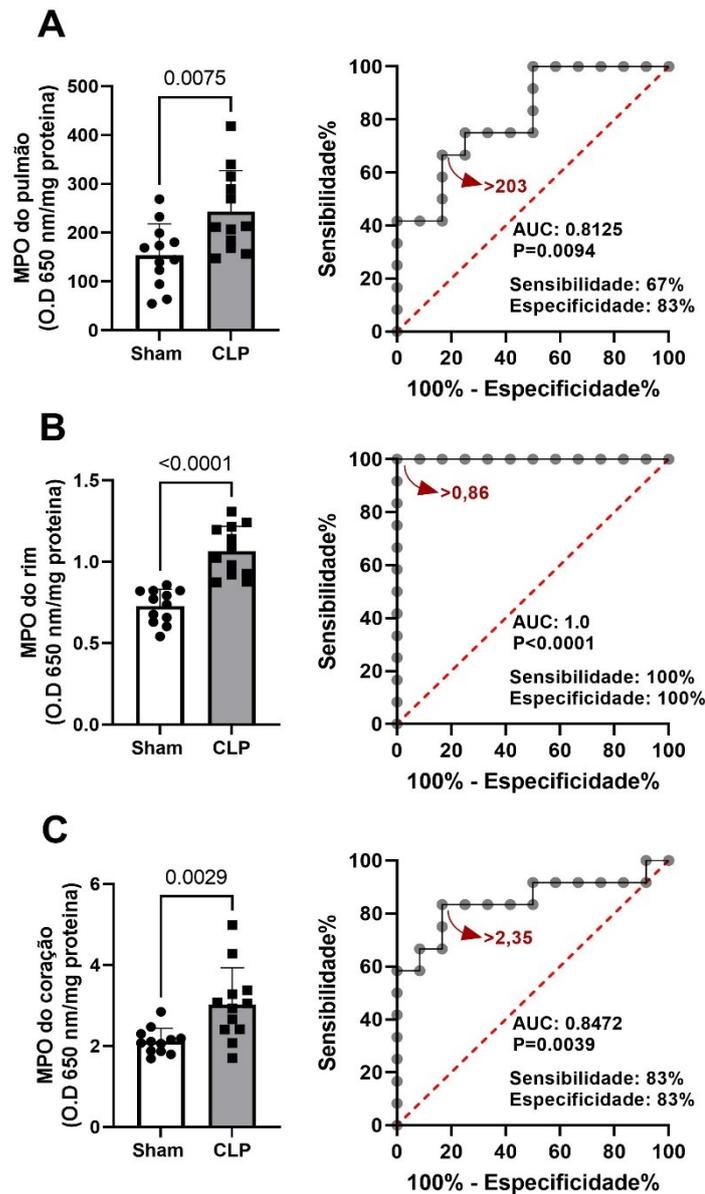
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Vinte e quatro horas após CLP ou falso procedimento, o sangue foi coletado para análise da ureia (A), creatinina (B), AST (C), ALT (D), glicemia (E) e lactato (F). Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos, sendo que cada ponto representa um animal, além da média \pm DP de 12 ratos por grupo. As análises estatísticas de lactato e uréia foram realizadas pelo Teste t não pareado. Creatinina, AST e ALT foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. O valor do ponto de corte para cada variável foi definido pelas curvas ROC por meio do Índice de Youden (indicado pelas setas). Os valores da área sob a curva (AUC), sensibilidade e especificidade também são mostradas dentro dos gráficos das curvas ROC.

4.3.3. Atividade enzimática mieloperoxidase (MPO)

Como pode ser observado na figura 8, no tempo de 24 horas após o procedimento de CLP houve o aumento da atividade enzimática para MPO no pulmão (Figura 8A), rim (Figura 8B) e coração (Figura 8C).

Para os valores de infiltrados de neutrófilos no tecido cardíaco (Figura 8C), o valor de corte (Índice de Youden) foi de 2,35 O.D 650 nm/mgproteína. Tanto a sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) como a especificidade (verdadeiro negativo) foi de 83%. A AUC para o tecido cardíaco foi de 0,84 e sua precisão diagnóstica é de 84%. Os valores de MPO para rim (Figura 8A) apresentaram um desempenho similar aos obtidos no coração. Os valores de MPO para o rim proporcionaram uma curva ROC ideal (sensibilidade=100%, especificidade=100%, e AUC=1,0). Os valores detalhados da análise da curva ROC com os valores de corte para MPO do pulmão e rim são mostrados na tabela 4.

Figura 8: Determinação de valores para a atividade enzimática mieloperoxidase por meio da curva ROC.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Vinte e quatro horas após CLP ou falso procedimento, os animais foram eutanasiados e os tecidos de pulmão (A), rim (B) e coração (C) coletados para mensuração das atividades da enzima MPO. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos, sendo que cada ponto representa um animal,

além da média \pm DP de 12 ratos por grupo. As análises estatísticas dos tecidos do rim e pulmão foram realizadas pelo Teste t não pareado. O tecido do coração foi analisado pelo teste de Mann-Whitney, devido a não homogeneidade de variância entre os grupos. O valor do ponto de corte para cada variável foi definido pelas curvas ROC por meio do Índice de Youden (indicado pelas setas). Os valores da área sob a curva (AUC), sensibilidade e especificidade também são mostradas dentro dos gráficos das curvas ROC.

Tabela 4: Valores de corte, índice de Youden, área sob a curva, sensibilidade e especificidade entre animais sépticos e saudáveis.

PARÂMETROS HEMODINÂMICOS				
Parâmetros	Índice de Youden	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)	AUC (95% IC)
Pressão arterial média (PAM)	<83,0 mmHg	91% (64 - 99)	100% (75 - 100)	0,98 (0,95-1,0)
Fluxo sanguíneo renal (FSR)	<278,1 PU	91% (64-99)	75% (46-91)	0,77 (0,57-0,77)
Resposta à antiotensina II (30 pmol/kg)	<28,38 mmHg	75% (47 - 91)	92% (65 - 99)	0,82 (0,64 – 1,00)
Resposta à Felinefrina (100 nmol/kg)	<73,76 mmHg	66% (39-86)	100% (75-100)	0,74 (0,52 – 0,96)
MARCADORES PLASMÁTICOS				
Creatinina	>0,51mg/dL	58% (31-80)	92% (64-99)	0,78 (0,60-0,97)
AST	>218,5 U/mL	100% (75-100)	92% (64-99)	0,97 (0,93-1,00)
ALT	>77,5 U/mL	58% (31-80)	100% (75-100)	0,84 (0,68-1,00)
Glicemia	< 89 mg/dL	92% (65 - 99)	100% (75-100)	0,97 (0,93-1,00)
Lactato	>2,65 mmol/L	100% (75-100)	100% (75-100)	1,0 (1,00 - 1,00)
MARCADORES DE LESÃO TECIDUAL				
MPO do pulmão	>203 (OD/mg proteína)	67% (39-86)	83% (55-97)	0,81 (0,64-0,98)
MPO do rim	>0,86 (OD/mg proteína)	100% (75-100)	100% (75-100)	1,0 (1,00-1,00)

MPO do coração	>2,35 (OD/mg proteína)	83% (55-97)	83% (55-97)	0,84 (0,67-1,00)
----------------	---------------------------	----------------	----------------	---------------------

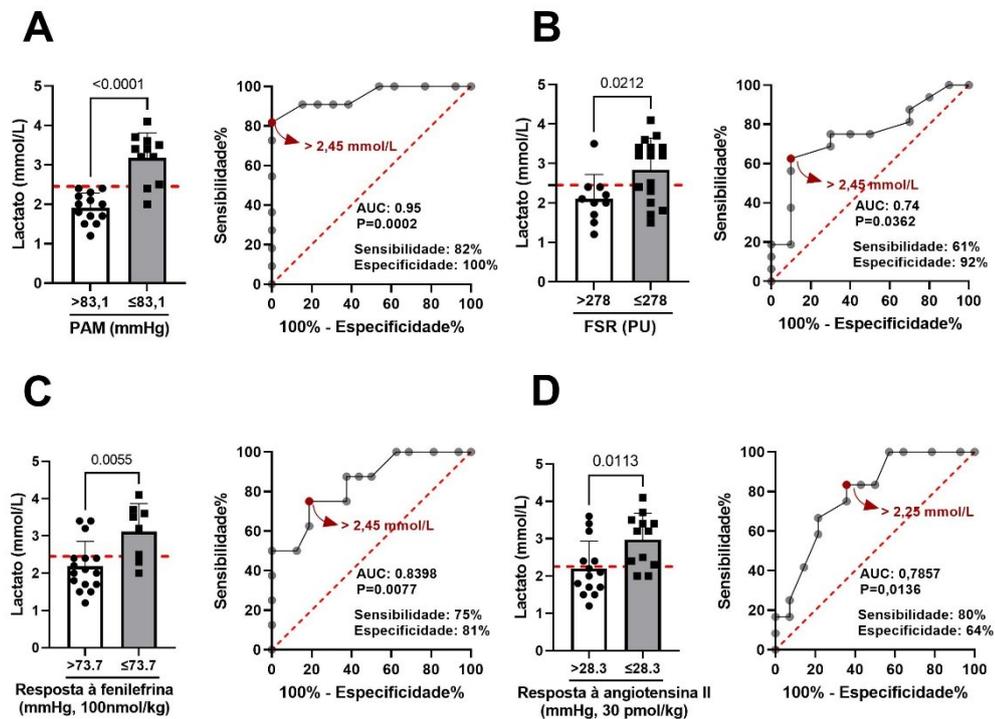
IC: Intervalo de confiança. OD: Densidade óptica.

4.4. DETERMINAÇÃO DO VALOR IDEAL DE LACTATO MEDIDO NO TEMPO DE 6 HORAS PARA PREVER MUDANÇAS SISTÊMICAS NA SEPSE

Após definirmos os valores de corte dos parâmetros avaliados no tempo de 24 horas, curvas ROC foram realizadas para analisar o desempenho prognóstico dos níveis de lactato como marcador das alterações para cada um dos parâmetros analisados. Iniciamos avaliando os valores de lactato medido em 6 horas após o procedimento. Para isso, os animais foram agrupados em saudáveis e sépticos para cada parâmetro hemodinâmico medido em 24 horas de acordo com o valor de corte previamente estabelecido (tabela 4).

O valor de corte (Índice de Youden) ideal de lactato medido no tempo de 6 horas capaz de prever uma diminuição da pressão arterial média (hipotensão) foi 2,45 mmol/L (Figura 9A). A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) foi 82% e especificidade (verdadeiro negativo) foi 100%. A área calculada sob a curva (AUC) para pressão arterial média foi de 0,95, indicando uma precisão diagnóstica de 95% para distinguir corretamente um animal normotenso de um hipotenso. A análise da curva ROC com os valores de corte de lactato para fluxo sanguíneo renal, resposta à fenilefrina e angiotensina II, são mostrados na figura 9 e tabela 5.

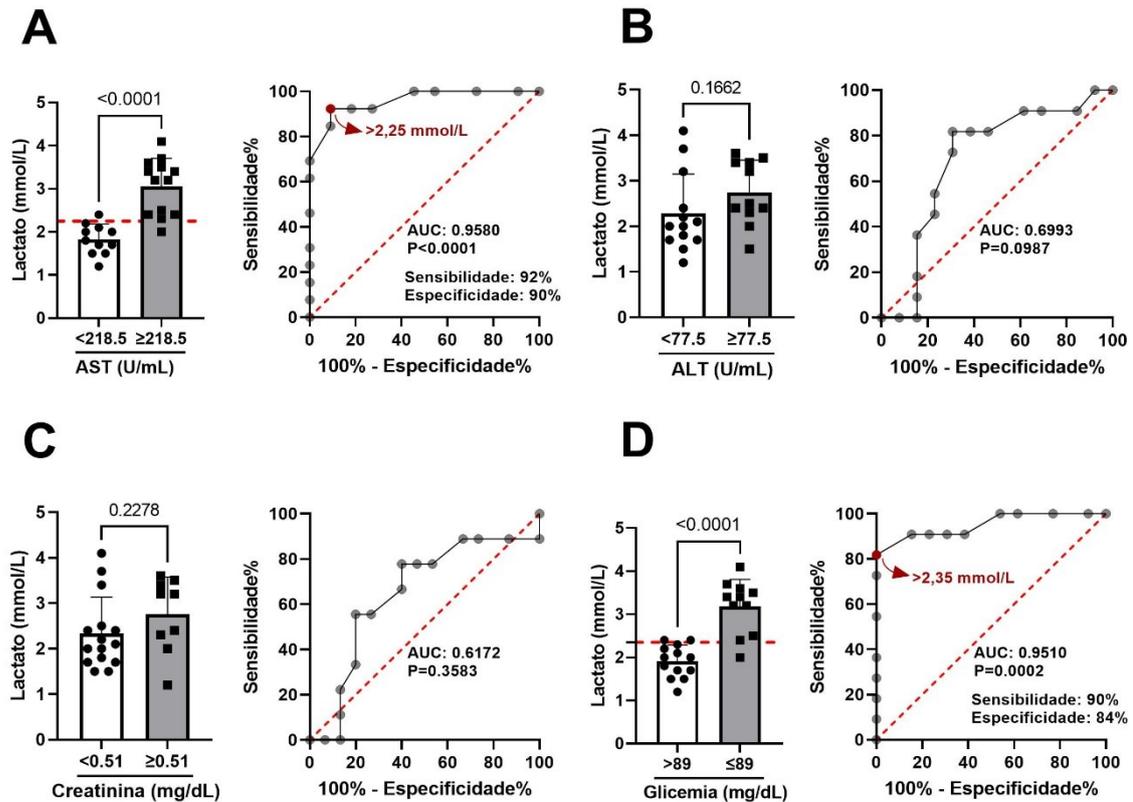
Figura 9: Definindo um valor ideal de lactato medido em 6 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Os animais foram agrupados em saudáveis e sépticos para cada parâmetro hemodinâmico medido em 24 h de acordo com o valor de corte (Figura 6 e tabela 4). Em seguida, curvas ROC foram realizadas para definir o valor ideal de lactato medido 6h após o procedimento (Sham ou CLP) para prever alterações cardiovasculares induzidas pela sepse. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos bem como a média \pm SD. A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. O painel direito mostra a curva ROC. O índice de Youden (J) é indicado pela seta dentro das curvas ROC.

Como pode ser observado na figura 10, o valor corte ideal de lactato medido no tempo de 6 horas capaz de prever um dano hepático (marcador AST) na sepse foi de 2,25 mmol/L. A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) foi 92%. Especificidade (verdadeiro negativo) foi 90%. A área calculada sob a curva (AUC) para AST foi de 0,95 e sua precisão prognóstica é de 95% para distinguir corretamente um animal saudável de um animal com prejuízo hepático. A análise da curva ROC com os valores de corte de lactato para glicemia são mostrados na figura 10 e tabela 5. Não houve diferença estatística entre os grupos Sham e CLP nos valores de ALT (Figura 10B) e creatinina (Figura 10C) impossibilitando a definição de valores de corte para este parâmetro. Como pode ser observada na figura 10, a curva ROC para estes parâmetros não são estatisticamente diferentes ($P > 0.5$).

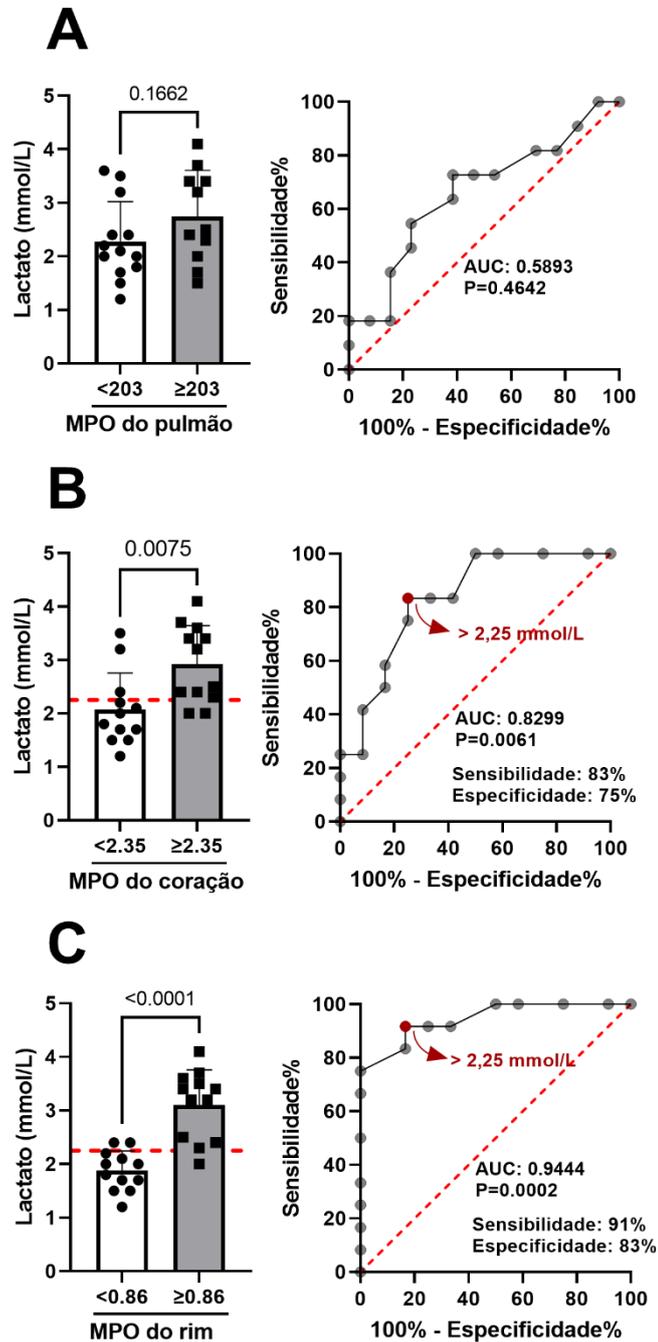
Figura 10: Definindo um valor ideal de lactato medido em 6 horas para prever o colapso hepático na sepse experimental.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Os animais foram agrupados em saudáveis e sépticos para cada parâmetro hemodinâmico medido em 24 h de acordo com o valor de corte (Figura 7 e tabela 4). Em seguida, curvas ROC foram realizadas para definir o valor ideal de lactato medido 6h após o procedimento (Sham ou CLP) para prever alterações cardiovasculares induzidas pela sepse. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos bem como a média \pm SD. A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. O índice de Youden (J) é indicado pela seta dentro das curvas ROC.

Como pode ser observado na figura 11, o valor corte ideal de lactato medido no tempo de 6 horas capaz de prever uma alta migração de neutrófilos para o tecido foi de 2,25 mmol/L no marcador MPO do tecido cardíaco. A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) foi 83%. A especificidade (verdadeiro negativo) foi 75%. A área calculada sob a curva (AUC) para o tecido cardíaco foi de 0,95. O valor da análise da curva ROC com o valor de corte para MPO do rim está mostrado na figura 11 e tabela 5. Não houve diferença estatística entre os grupos Sham e CLP nos valores no tecido do pulmão (Figura 11A) impossibilitando a definição de valores de corte para este parâmetro.

Figura 11: Definindo um valor ideal de lactato medido em 6 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Os animais foram agrupados em saudáveis e sépticos para os valores de MPO medidos em 24 hnos diferentes tecidos de acordo com o valor de corte (Figura 8 e tabela 4). Em seguida, curvas ROC foram realizadas para definir o valor ideal de lactato medido 6h após o procedimento (Sham ou CLP) para prever uma alta migração de neutrófilos para os tecidos do pulmão, coração e rim na sepse. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos bem como a média \pm SD. A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. O índice de Youden (J) é indicado pela seta dentro das curvas ROC.

Tabela 05: Valores de lactato medido no tempo de 6 horas para prever disfunções sistêmicas

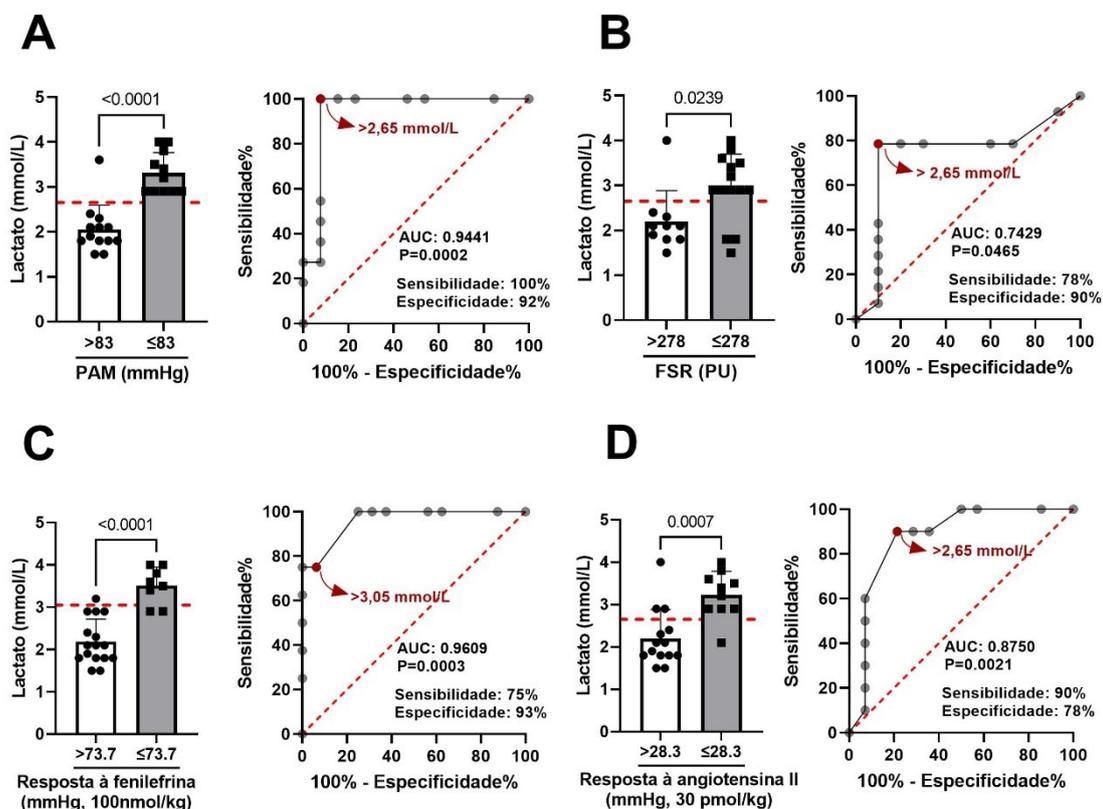
PARÂMETROS HEMODINÂMICOS				
Parâmetros	Índice de Youden	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)	AUC (95% IC)
Hipotensão (≤ 83 mmHg)	2,45 mmol/L	82% (52-96)	100% (77-100)	0,95 (0,86-1,00)
Redução do fluxo sanguíneo renal (≤ 278 PU)	2,45 mmol/L	61% (38-81)	92% (59-99)	0,74 (0,54-0,94)
Hiporresponsividade à resposta da fenilefrina (≤ 73.7 mmHg)	2,45 mmol/L	75% (40-95)	81% (56-93)	0,83 (0,67-1,00)
Hiporresponsividade à resposta da angiotensina (≤ 28.3 mmHg)	2,25 mmol/l	83% (55-97)	64% (39-83)	0,77 (0,61-0,96)
MARCADORES PLASMÁTICOS				
Níveis elevados de AST (≥ 218.5 U/mL)	2,25 mmol/L	92% (66-99)	90% (62-99)	0,95 (0,88-1,00)
Níveis elevados de glicemia (< 89 mg/Dl)	2,35 mmol/L	90% (62-99)	84% (57-97)	0,95 (0,86-1,0)
MARCADORES DE LESÃO TECIDUAL				
MPO do coração (≥ 2.35 OD/mg proteína)	2,25 mmol/L	83% (55-97)	75% (46-91)	0,82 (0,66-0,99)
MPO do rim (≥ 0.86 OD/mg proteína)	2,25 mmol/L	91% (64-99)	83% (55-97)	0,94 (0,85-1,00)

IC: Intervalo de confiança. OD: Densidade óptica.

4.5. DETERMINAÇÃO DO VALOR IDEAL DE LACTATO MEDIDO NO TEMPO DE 12 HORAS PARA PREVER MUDANÇAS SISTÊMICAS NA SEPSE

No tempo de 12 horas, continuamos medindo os valores de lactato para prever o colapso cardiovascular e hepático na sepse. Como podemos constatar na figura 12A, o valor corte (Índice de Youden) ideal de lactato medido no tempo de 12 horas capaz prever a diminuição do fluxo sanguíneo renal foi 2,65 mmol/L. A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) foi 78% e especificidade (verdadeiro negativo) foi 90%. A área calculada sob a curva (AUC) para fluxo sanguíneo renal foi de 0,74. A análise da curva ROC com os valores de corte de lactato para pressão arterial média, resposta à fenilefrina e angiotensina II, são mostrados na figura 12 e tabela 6.

Figura 12: Definindo um valor ideal de lactato medido em 12 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.

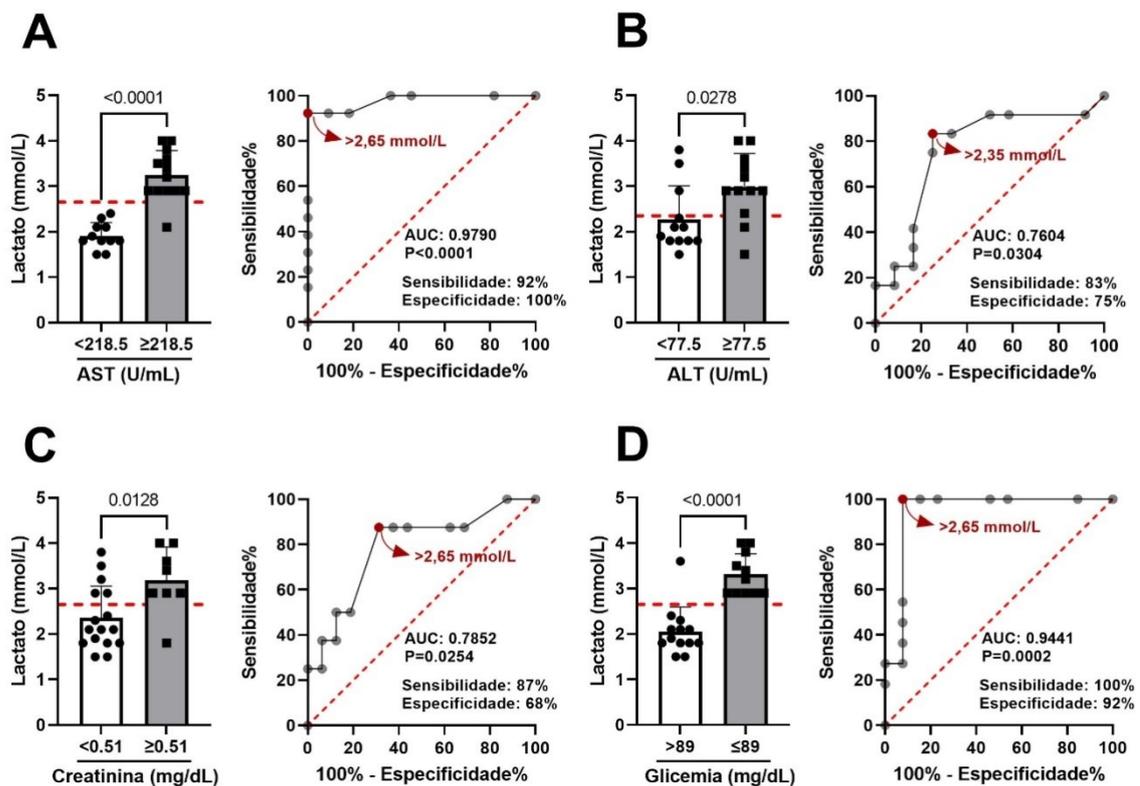


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Os animais foram agrupados em saudáveis e sépticos para cada parâmetro hemodinâmico medido em 24 h de acordo com o valor de corte (Figura 6 e tabela 4). Em seguida, curvas ROC foram realizadas para definir o valor ideal de lactato medido 12h após o procedimento (Sham ou CLP) para prever alterações cardiovasculares induzidas pela

sepse. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos bem como a média \pm SD. A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. O índice de Youden (J) é indicado pela seta dentro das curvas ROC.

Na figura 13B, o valor corte ideal de lactato medido no tempo de 12 horas capaz de prever o dano hepático na sepse foi de 2,65 mmol/L para o marcador ALT. A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) foi 92%. Especificidade (verdadeiro negativo) foi 100%. A área calculada sob a curva (AUC) para AST foi de 0,97, portanto, apresenta boa precisão prognóstica de 95% para distinguir corretamente um animal saudável de um com lesões hepáticas. A análise da curva ROC com os valores de corte de lactato para ALT, creatinina e glicemia são mostrados na figura 13 e tabela 6.

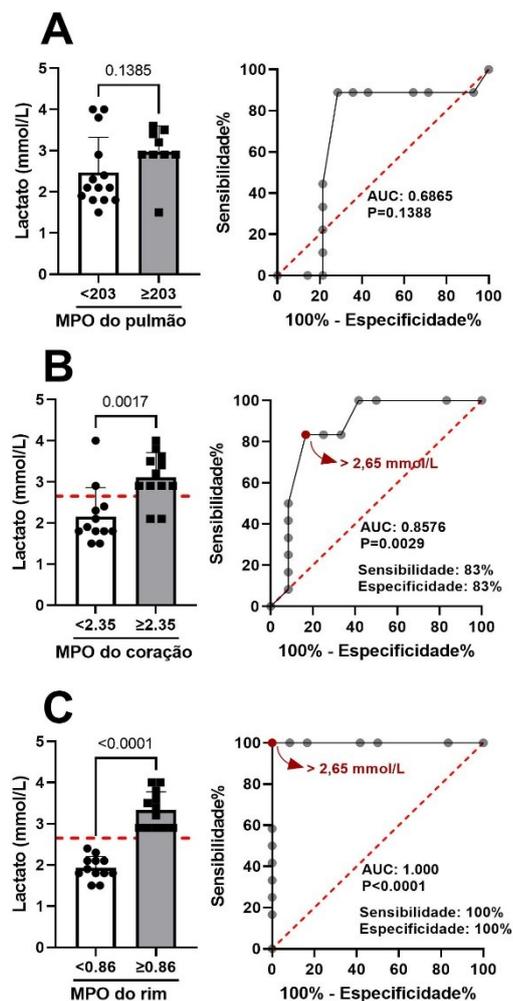
Figura 13: Definindo um valor ideal de lactato medido em 12 horas para prever o colapso hepático na sepse experimental.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Os animais foram agrupados em saudáveis e sépticos para cada parâmetro hemodinâmico medido em 24 h de acordo com o valor de corte (Figura 7 e tabela 4). Em seguida, curvas ROC foram realizadas para definir o valor ideal de lactato medido 12h após o procedimento (Sham ou CLP) para prever alterações cardiovasculares induzidas pela sepse. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos bem como a média \pm SD. A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. O índice de Youden (J) é indicado pela seta dentro das curvas ROC.

Como pode ser observado na figura 14C, o valor corte ideal de lactato medido no tempo de 12 horas capaz de prever uma alta migração de neutrófilos para o tecido renal foi 2,65 mmol/L. A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) foi 100%. Especificidade (verdadeiro negativo) foi 100%. A área calculada sob a curva (AUC) para o tecido cardíaco foi de 1,00, portanto tem precisão prognóstica de 100% para distinguir corretamente um animal saudável e doente. O valor da análise da curva ROC com o valor de corte para MPO do coração está mostrado na figura 14 e tabela 6. Não houve diferença estatística entre os grupos Sham e CLP nos valores no tecido do pulmão (Figura 14A) impossibilitando a definição de valores de corte para este parâmetro.

Figura 14: Definindo um valor ideal de lactato medido em 12 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Os animais foram agrupados em saudáveis e sépticos para os valores de MPO medidos em 24 h nos diferentes tecidos de acordo com o valor de corte (Figura 8 e tabela 4). Em seguida, curvas ROC foram realizadas para definir o valor ideal de lactato medido 12h após o procedimento (Sham ou CLP) para prever uma alta migração de neutrófilos para os tecidos do pulmão, coração e rim na sepse. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos bem como a média \pm SD. A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. O índice de Youden (J) é indicado pela seta dentro das curvas ROC.

Tabela 6: Valores de lactato medido no tempo de 12 horas para prever disfunções sistêmicas

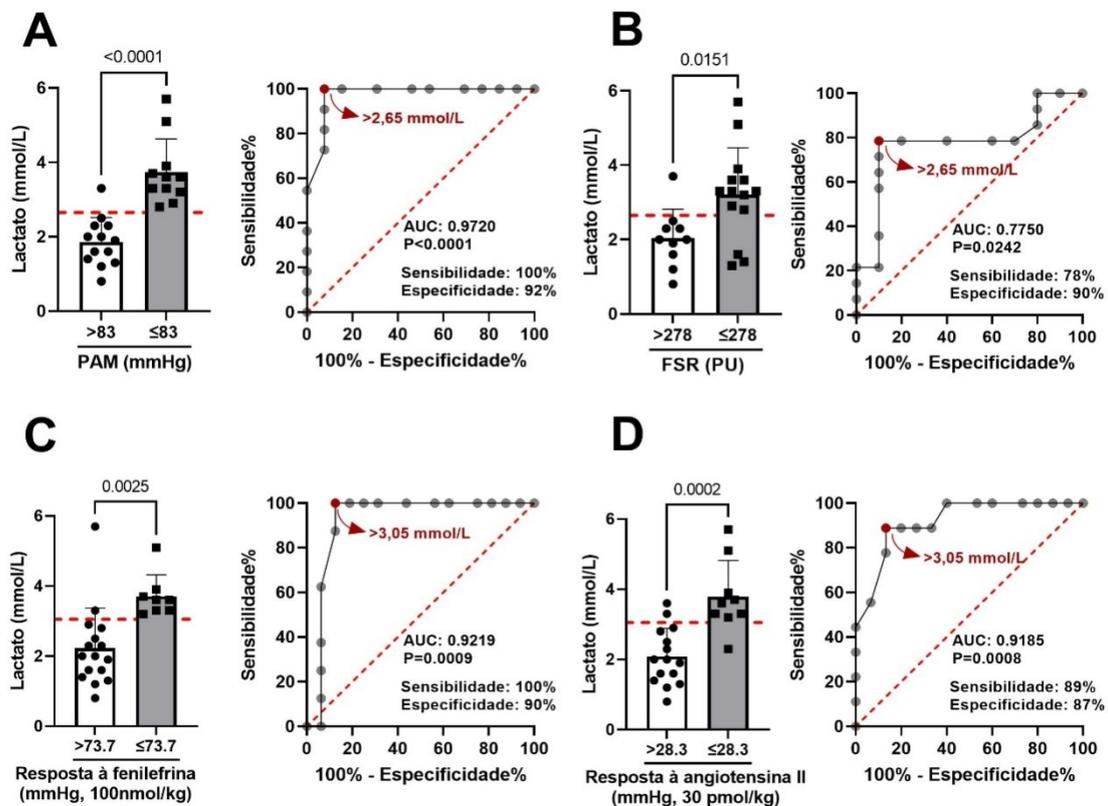
PARÂMETROS HEMODINÂMICOS				
Parâmetros	Índice de Youden	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)	AUC (95% IC)
Hipotensão (≤ 83 mmHg)	2,65 mmol/L	100% (74-100)	92% (66-99)	0,94 (0,83-1,00)
Redução do fluxo sanguíneo renal (≤ 278 PU)	2,65 mmol/L	78% (52-92)	90% (59-99)	0,74 (0,51-0,96)
Hiporresponsividade à resposta da fenilefrina (≤ 28.3 mmHg)	3,05 mmol/L	75% (40-95)	93% (71-99)	0,96 (0,89-1,00)
Hiporresponsividade à resposta da angiotensina II (≤ 28.3 mmHg)	2,65 mmol/L	90% (59-99)	78% (52-92)	0,87 (0,72-1,00)
MARCADORES PLASMÁTICOS				
Níveis elevados de AST (≥ 218.5 U/mL)	2,65 mmol/L	92% (66-99)	100% (74-100)	0,97 (0,93-1,00)
Níveis elevados de ALT (≥ 77.5 U/mL)	2,35 mmol/L	83% (55-97)	75% (46-91)	0,76 (0,55-0,96)
Níveis elevados de creatinina (≥ 0.51 mg/dL)	2,65 mmol/L	87% (52-99)	68% (44-85)	0,78 (0,58-0,98)
Hipoglicemia (≤ 89 mg/dL)	2,65 mmol/L	100% (74-100)	92% (66-99)	0,94 (0,83-1,00)
MARCADORES DE DANO TECIDUAL				
MPO do coração (≥ 2.35 OD/mg proteína)	2,65 mmol/L	83% (55-97)	83% (55-97)	0,85 (0,69-1,00)
MPO do rim (≥ 0.86 OD/mg proteína)	2,65 mmol/L	100% (75-100)	100% (75-100)	1,0 (1,00-1,00)

IC: Intervalo de confiança. OD: Densidade óptica.

4.6. DETERMINAÇÃO DO VALOR IDEAL DE LACTATO MEDIDO NO TEMPO DE 24 HORAS PARA PREVER MUDANÇAS SISTÊMICAS NA SEPSE

Por fim, utilizamos o valor de lactato medido no tempo de 24 horas para avaliar o potencial como marcador diagnóstico das alterações sistêmicas avaliadas. Na figura 15^a, pode-se observar que o valor do corte (Índice de Youden) ideal de lactato medido no tempo de 24 horas capaz de indicar uma diminuição da pressão arterial média (hipotensão) foi de 2,65 mmol/L. A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) foi 100% e especificidade (verdadeiro negativo) foi 92%. A área calculada sob a curva (AUC) para PAM foi de 0,97. Estão demonstrados na figura 15 e tabela 7 a análise da curva ROC com os valores de corte de lactato para fluxo sanguíneo renal, resposta à fenilefrina e angiotensina II.

Figura 15: Definindo um valor ideal de lactato medido em 24 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.

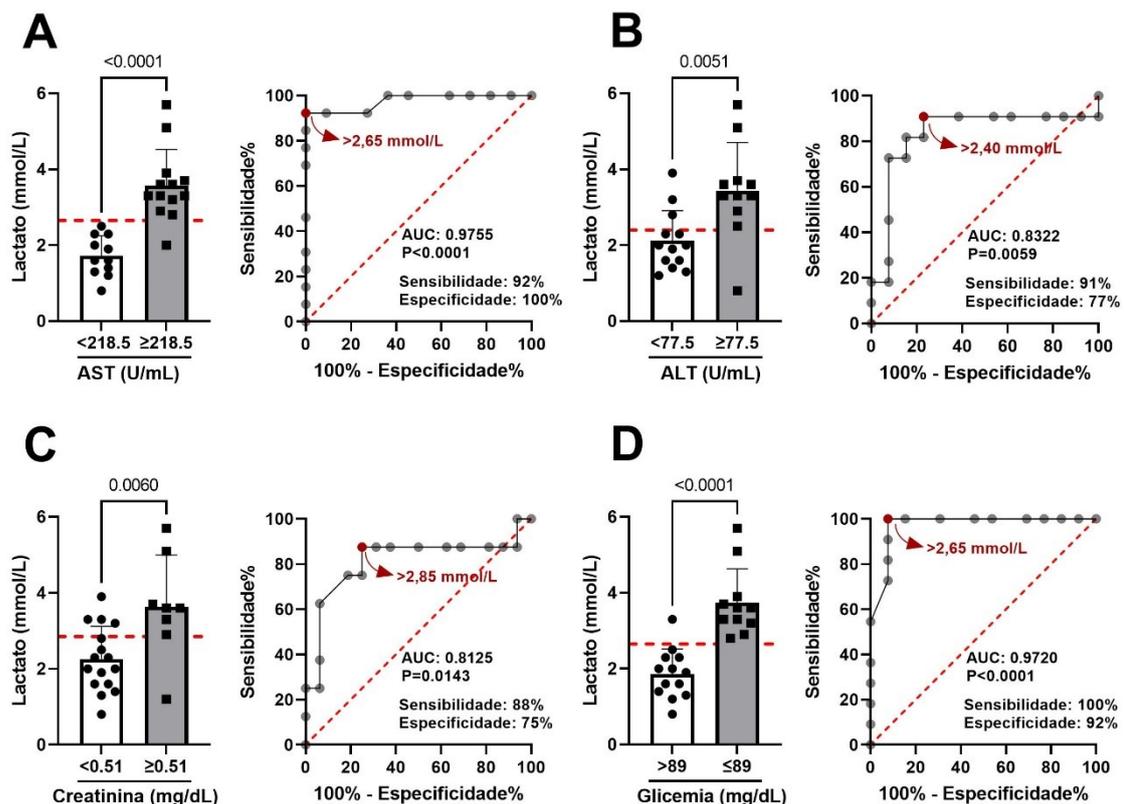


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Os animais foram agrupados em saudáveis e sépticos para cada parâmetro hemodinâmico medido em 24 h de acordo com o valor de corte (Figura 6 e tabela 4). Em seguida, curvas ROC foram realizadas para definir o valor ideal de lactato medido 12h após o procedimento (Sham ou CLP) para prever alterações cardiovasculares induzidas pela sepse. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos

bem como a média \pm SD. A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. O índice de Youden (J) é indicado pela seta dentro das curvas ROC.

Na figura 16B, o valor corte ideal de lactato medido no tempo de 24 horas capaz de indicar dano hepático (marcador ALT) na sepse foi de 2,40 mmol/L. A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) foi 91%. Especificidade (verdadeiro negativo) foi 77%. A área calculada sob a curva (AUC) para AST foi de 0,83. Para glicemia (Figura 16D), o valor corte ideal de lactato foi de 2,65 mmol/L. Sensibilidade foi de 100%. Especificidade foi de 92%. A área calculada sob a curva (AUC) para glicemia foi de 0,97. A análise da curva ROC com os valores de corte de lactato capaz de prever um colapso hepático utilizando os marcadores AST e creatinina são mostrados na figura 16 e tabela 7.

Figura 16: Definindo um valor ideal de lactato medido em 24 horas para prever o colapso hepático na sepse experimental.

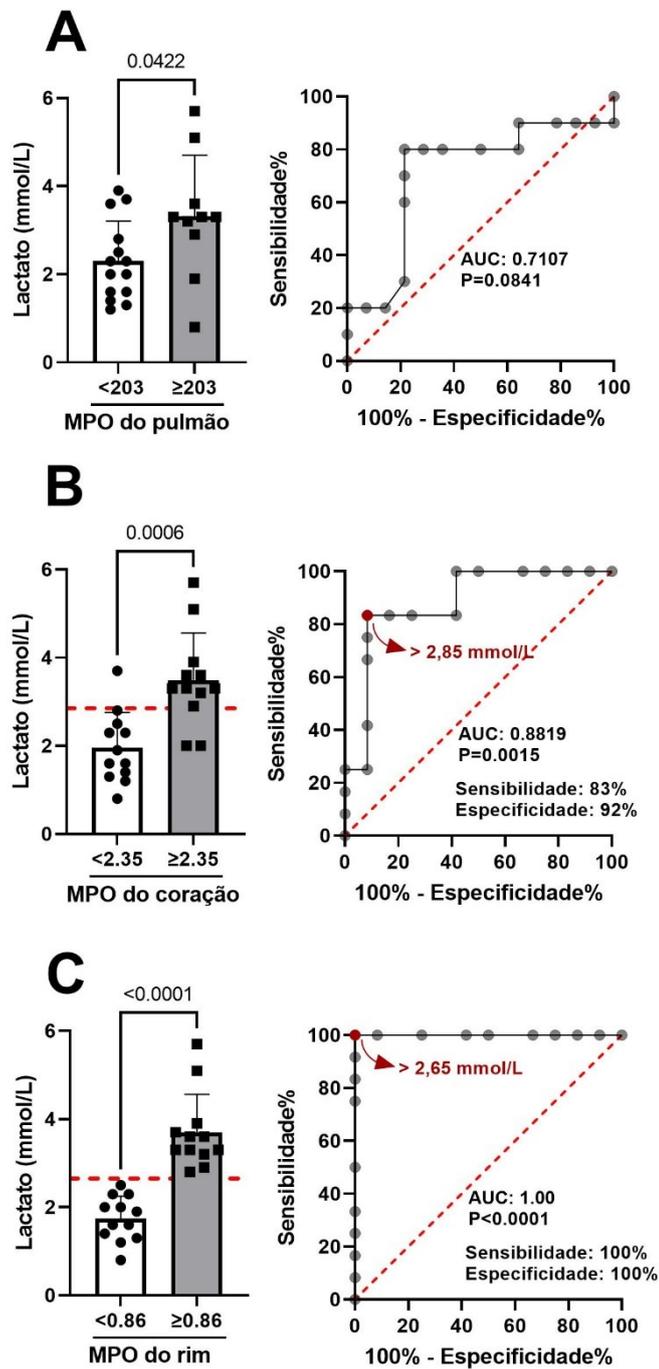


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Os animais foram agrupados em saudáveis e sépticos para cada parâmetro bioquímico medido em 24 h de acordo com o valor de corte (Figura 7 e tabela 4). Em seguida, curvas ROC foram realizadas para definir o valor ideal de lactato medido 24h após o procedimento (Sham ou CLP) para prever alterações cardiovasculares induzidas pela sepse. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos bem como a média \pm SEM. A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. O índice de Youden (J) é indicado pela seta dentro das curvas ROC.

Como pode ser observado na figura 17C, o valor corte ideal de lactato medido no tempo de 24 horas capaz de indicar uma alta migração de neutrófilos para o tecido foi de 2,65 mmol/L no marcador MPO do tecido renal. A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) foi 100%. Especificidade (verdadeiro negativo) foi 100%. E a área calculada sob a curva (AUC) para o tecido renal foi de 1,00, e sua precisão diagnóstica é de 100% para distinguir corretamente um animal saudável e doente.

Para o tecido cardíaco (Figura 17B), o valor corte ideal de lactato foi de 2,85 mmol/L. Sensibilidade foi de 83%. Especificidade foi de 92%. A área calculada sob a curva (AUC) para glicemia foi de 0,88. Não houve diferença estatística entre os grupos Sham e CLP nos valores no tecido do pulmão (Figura 17A) impossibilitando a definição de valores de corte para este parâmetro.

Figura 17: Definindo um valor ideal de lactato medido em 24 horas para prever o colapso cardiovascular na sepse experimental.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Notas: Os animais foram agrupados em saudáveis e sépticos para os valores de MPO medidos em 24 hnos diferentes tecidos de acordo com o valor de corte (Figura 8 e tabela 4). Em seguida, curvas ROC foram realizadas para definir o valor ideal de lactato medido 24h após o procedimento (Sham ou CLP) para prever uma alta migração de neutrófilos para os tecidos do pulmão, coração e rim na sepse. Para cada variável, o painel esquerdo mostra os dados expressos como gráficos de pontos bem como a média \pm SD. A análise estatística foi realizada usando o teste t não pareado. O índice de Youden (J) é indicado pela seta dentro das curvas ROC.

Tabela 7: Valores de lactato medido no tempo de 24 horas para prever disfunções sistêmicas

PARÂMETROS HEMODINÂMICOS				
Parâmetros	Índice de Youden	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)	AUC (95% IC)
Hipotensão (≤ 83 mmHg)	2,65 mmol/L	100% (74-100)	92% (66-99)	0,97 (0,91-1,00)
Redução do fluxo sanguíneo renal (≤ 278 PU)	2,65 mmol/L	78% (52-92)	90% (59-99)	0,77 (0,57-0,97)
Hiporresponsividade à resposta da fenilefrina (≤ 28.3 mmHg)	3,05 mmol/L	100% (67-100)	90% (63-97)	0,92 (0,79-1,00)
Hiporresponsividade à resposta da angiotensina II (≤ 28.3 mmHg)	3,05 mmol/L	89% (56-99)	87% (62-97)	0,91 (0,80-1,00)
MARCADORES PLASMÁTICOS				
Níveis elevados de AST (≥ 218.5 U/mL)	2,65 mmol/L	92% (66-99)	100% (74-100)	0,97 (0,92-1,00)
Níveis elevados de ALT (≥ 77.5 U/mL)	2,40 mmol/L	91% (62-99)	77% (49-91)	0,83 (0,63-1,00)
Níveis elevados de creatinina (≥ 0.51 mg/dL)	2,85 mmol/L	88% (52-99)	75% (50-89)	0,81 (0,59-1,00)
Hipoglicemia (≤ 89 mg/dL)	2,65 mmol/L	100% (74-100)	92% (66-99)	0,97 (0,91-1,00)
MARCADORES DE DANO TECIDUAL				
MPO do coração (≥ 2.35 OD/mg proteína)	2,85 mmol/L	83% (55-97)	92% (64-99)	0,88 (0,73-1,00)
MPO do rim (≥ 0.86 OD/mg proteína)	2,65 mmol/L	100% (75-100)	100% (75-100)	1,0 (1,00-1,00)

IC: Intervalo de confiança. OD: Densidade óptica.

5. DISCUSSÃO

A sepse é uma disfunção orgânica ocasionada por um agente agressor, que gera alterações circulatórias, celulares e metabólicas. Neste estudo, mostramos que a indução da sepse por meio do modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP) reproduziu aspectos clínicos da sepse humana, como hipotensão, hiporreatividade a vasoconstritores, diminuição do fluxo sanguíneo renal, disfunção de órgãos, aumento dos níveis de lactato sanguíneo, hipoglicemia e a presença de infiltrados de neutrófilos no tecido cardíaco, pulmonar e renal. O modelo de CLP demonstrou ser uma técnica eficaz para replicar os aspectos fisiológicos e a progressão da sepse humana em animais, revelando, assim, ser ferramenta experimental valiosa para prever mudanças sistêmicas.

Algumas alterações induzidas pelo CLP são bastante consistentes, como por exemplo, a hipotensão, aumento dos níveis de AST e a hipoglicemia. A análise de cada valor individual que pode ser observada no gráfico de pontos (Figuras 6A, 7C, 7E) mostra que praticamente todos os animais submetidos a este procedimento são diferentes dos animais controle. Por outro lado, parâmetros como a resposta à vasoconstritores, níveis plasmáticos de creatinina e temperatura corporal apresentam alta dispersão (Figura 6), comprometendo a precisão dos resultados. Desta forma, torna-se crucial procurar marcadores que possam reduzir a variabilidade nos dados.

O lactato é um excelente indicador de hipoperfusão e hipóxia tecidual em pacientes com sepse/choque séptico e é comumente utilizado na clínica para auxiliar o prognóstico, diagnóstico, avaliar a progressão e gravidade da doença e monitorar a resposta ao tratamento (MÉNDEZ et al., 2023). Interessantemente, na sepse induzida pelo procedimento de CLP em ratos observamos que os níveis de lactato já estão aumentados no tempo de 6 horas após o procedimento. Neste momento, a pontuação do escore de gravidade (Figura 5) ainda é considerada baixa e não há mortalidade. Por estas circunstâncias, podemos considerar o lactato um biomarcador elegível para avaliar gravidade prognóstica na sepse induzida pelo modelo CLP.

Conforme mencionado por Zhai e colaboradores (2018), o lactato é um potencial biomarcador de sepse e pode ser usado para discriminar sepse de infecção não complicada. No entanto, os autores avaliaram os níveis de lactato

apenas 24 horas após o procedimento de CLP, e em muitos estudos, as intervenções precisam ser realizadas antes desta hora. Além de não avaliar parâmetros cardiovasculares e renais. Por conseguinte, nosso estudo buscou determinar um valor de corte para lactato medido precocemente, avaliando também parâmetros cardiovasculares, renais e hemodinâmicos, a fim de ajudar a aprimorar os protocolos experimentais por meio da distinção da gravidade da sepse.

Um desafio enfrentado em nossa pesquisa experimental foi a ausência de valores de referenciais para marcadores hemodinâmicos e bioquímicos, bem como a escassez de estudos de referência relacionados à previsão de sepse em modelos experimentais. Portanto, frente às dificuldades encontradas definimos os valores de corte para distinguir animais saudáveis e doentes para cada parâmetro avaliado, estabelecendo valores referenciais a serem utilizados no estudo.

Em nosso estudo, foi importante determinar os valores de corte dos parâmetros cardiovasculares e hemodinâmicos, pois, por meio de seus valores encontrados nas curvas ROC conseguimos distinguir animais saudáveis de animais sépticos, hipotensos de normotensos. Assim, foi determinado que animais com a pressão arterial média abaixo de 83,01 mm/Hg é hipotenso (Figura 6A), animais com o nível sanguíneo de 218,5 U/mL de AST (Figura 7C) indica a presença de lesão hepática, e níveis glicêmicos abaixo de 89 mg/dl (Figura 7E) indica animais hiperglicêmicos. De fato, definir valores de corte como referenciais para distinguir os animais facilita entender a progressão da doença em modelos experimentais, identificando mais facilmente a hipotensão, danos hepáticos, renais e um pico hiperglicêmico, diminuindo os riscos de mortalidade dos animais.

Após definirmos os valores de corte para parâmetros cardiovasculares e bioquímicos, determinamos valores ideais de lactato medido no tempo de 6 horas capaz de prever mudanças sistêmicas na sepse. Nesta análise, de acordo com as informações acima, nos valores de corte previamente determinados os animais foram separados em saudáveis ou doentes para cada um dos parâmetros analisados. O valor de lactato destes dois grupos foi então usado para realização de curvas ROC. Assim, por meio da análise dos dados da curva ROC, demonstramos que o valor de lactato de 2,45 mmol/L é o melhor valor para predizer hipotensão em animais submetidos a CLP. A AUC de 0,95 mostra que usando este valor de lactato medido em 6 horas o pesquisador tem 95% de chance para distinguir corretamente

um animal saudável de um animal com colapso hipotensão. A capacidade de identificar os verdadeiros ratos hipotensos é alta (sensibilidade: 82%) e a taxa de falsos positivos é zero (especificidade de 100%) demonstrado na Figura 8A.

Encontramos o mesmo valor de corte (2,45 mmol/L) para o lactato que separou a resposta normal à fenilefrina da hiporresponsividade, uma característica muito específica no choque séptico. A probabilidade de distinguir corretamente um rato normal e hiporreativo é de 84% (AUC: 0,84). No entanto, os valores de sensibilidade e especificidade não apresentam bons resultados, o que pode ser atribuído à maior variabilidade (MANDREKAR, 2010). O mesmo valor limiar foi encontrado para prever a redução do fluxo sanguíneo renal (2,45 mmol/L) 6 horas após induzir a sepse no modelo de CLP.

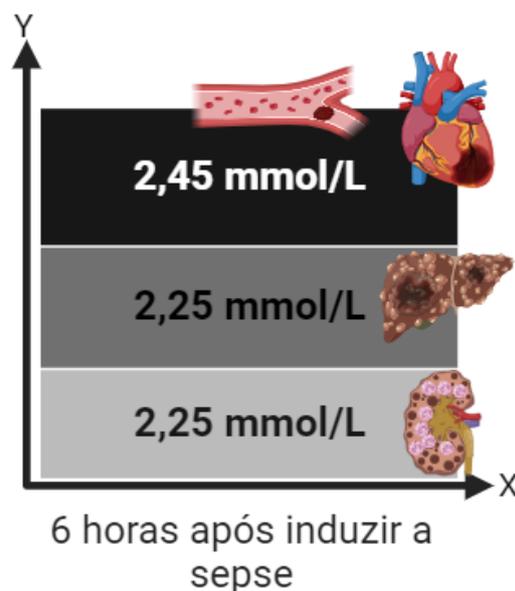
Para prever a hiporesponsividade à angiotensina II, o valor de corte ideal de lactato em 6 horas foi de 2,25 mmol/L, com taxa de verdadeiro positivo e verdadeiro negativo de 80% e 64%, respectivamente. Embora o valor do limiar de lactato para angiotensina II, determinado pelo índice de Youden, tenha sido um pouco menor comparado a fenilefrina, recomendamos manter o mesmo valor de corte para os demais parâmetros cardiovasculares (2,45 mmol/L) (Figura 18).

O valor de corte ideal de lactato em 6 horas capaz de prever dano hepático (marcador de AST) na sepse foi de 2,25 mmol/L (Figura 18). Curiosamente, a capacidade de identificar os ratos que de fato apresentam dano hepático agudo é alto (sensibilidade: 92% e especificidade: 90%). O mesmo valor limiar foi encontrado para prever uma alta migração de neutrófilos para o tecido renal (2,25 mmol/L) 6 horas após induzir a sepse no modelo de CLP. Em relação à glicemia, capacidade de identificar os ratos hiperglicêmico é relativamente alta (sensibilidade: 90% e especificidade 84%) e seu valor de corte ideal de lactato em 6 horas foi de 2,35 mmol/L.

Portanto, mensurar os níveis de lactato dentro de um período de 6 horas nos animais é importante, pois, possibilita identificar precocemente complicações sistêmicas no modelo experimental, identificar quadro inicial de sepse e prever mais facilmente a progressão da sepse nos animais (Figura 18). Assim, quanto mais cedo prever as alterações sistêmicas na sepse, melhor será o diagnóstico e tratamento da doença, diminuindo os riscos de mortalidade. Desse modo, em nosso estudo, observamos que o tempo de 6 horas se destaca como o momento mais crítico e

eficaz para a previsão da sepse usando o marcador lactato, embora também tenhamos avaliado os mesmos parâmetros no tempo de 12 e 24 horas após CLP. Por fim, os marcadores hemodinâmicos e bioquímicos, como a PAM, AST e glicemia, demonstram dados consistentes, com AUC excelente, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade quando avaliados no período de 6 horas após a realização da CLP.

Figura 18: Valor de corte de lactato capaz de prever uma disfunção cardíaca, hepática e alta migração de neutrófilos para o tecido renal em 6 horas.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Valores de corte de lactato capaz de prever uma disfunção cardíaca, hepática e alta migração de neutrófilos para o tecido renal. Eixo Y, indica os valores de lactato.

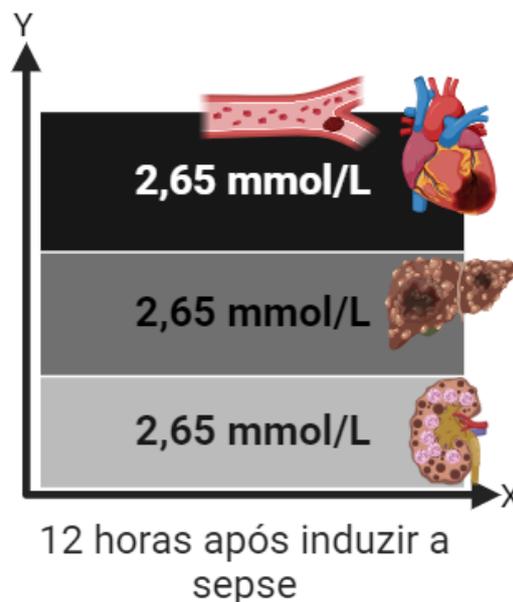
Por intermédio da análise dos dados da curva ROC, determinamos também valores ideais de lactato medido no tempo de 12 horas para prever mudanças sistêmicas na sepse. Demonstramos que o valor de lactato de 2,65 mmol/L é o melhor valor de para prever hipotensão, redução do fluxo sanguíneo renal e hiporresponsividade à angiotensina II em animais submetidos a CLP (Figura 19).

O valor de corte ideal de lactato em 12 horas capaz prever dano hepático (marcador de AST) na sepse foi de 2,65 mmol/L (Figura 19). Curiosamente, a capacidade de identificar os ratos que de fato apresentam dano hepático agudo é alto (sensibilidade: 92% e especificidade: 100%). O mesmo valor limiar foi

encontrado para prever uma alta migração de neutrófilos para o tecido renal (2,65 mmol/L) 12 horas após induzir a sepse no modelo de CLP (Figura 19). Em relação à glicemia, capacidade de identificar os ratos hiperglicêmicos é relativamente alta (sensibilidade: 100% e especificidade 92%) e seu valor de corte ideal de lactato em 12 horas foi de 2,65 mmol/L.

No geral, no tempo de 12 horas é possível perceber que a maioria dos parâmetros avaliados apresentou o valor de corte de 2,65 mmol/L de lactato (Figura 19), isto pode ser devido a grandes alterações sistêmicas nos animais induzidos a sepse. Quando comparamos os valores de corte de lactato no tempo de 12 horas e de 6 horas, conseguimos perceber que no tempo de 6 horas os valores são melhores e, portanto, pode ser mais útil para prever precocemente. Assim, determinar valores de lactato no período de 12 horas pode ser útil no tratamento e a mensuração pode ser utilizada como critério de exclusão ou até mesmo a separação dos grupos de animais sépticos, avaliando a gravidade (dano grave e não grave).

Figura 19: Valor de corte de lactato capaz de prever uma disfunção cardíaca, hepática e alta migração de neutrófilos para o tecido renal em 12 horas.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Valores de corte de lactato capaz de prever uma disfunção cardíaca, hepática e alta migração de neutrófilos para o tecido renal. Eixo Y indica os valores de lactato.

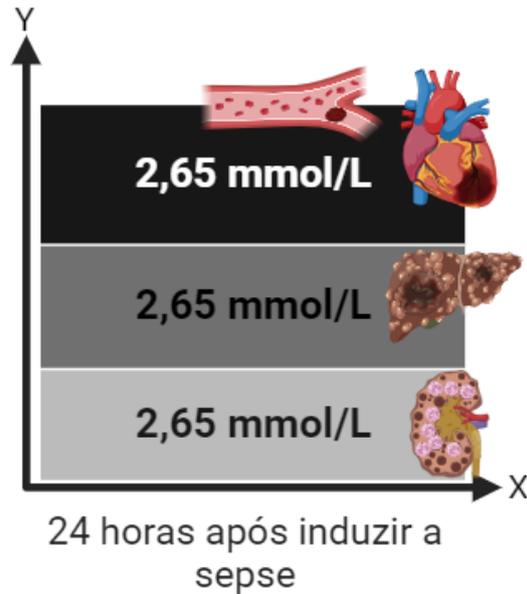
Por fim, determinamos os valores ideais de lactato medido no tempo de 24 horas que neste caso tem valor diagnóstico já que a análise dos diferentes parâmetros foi realizada imediatamente após a mensuração dos níveis de lactato. Os valores descritos a partir deste ponto podem ser utilizados para confirmar disfunções sistêmicas acarretadas pela sepse e choque séptico.

Assim, por método da análise dos dados da curva ROC, demonstramos que o valor de lactato de 2,65 mmol/L é o melhor valor de diagnosticar uma hipotensão e uma redução do fluxo sanguíneo renal em animais submetidos à CLP. Suas respectivas AUC são 0,97 (PAM) e 0,77 (FSR), mostrando serem bons marcadores para o diagnóstico da sepse. Contudo, parâmetro FSR (AUC: 0,74) apresenta maior variabilidade dentro de cada grupo. Para diagnosticar uma hiporresponsividade à fenilefrina e angiotensina II, o valor de corte ideal de lactato em 24 horas foi de 3,05 mmol/L. A AUC para fenilefrina foi de 92% (0,92) e para angiotensina II foi de 91% (0,91), mostrando ser um excelente marcador para avaliar uma hiporesponsividade na sepse.

O valor de corte ideal de lactato em 24 horas, capaz de diagnosticar um colapso hepático (marcador AST) e uma hipoglicemia na sepse, foi de 2,65 mmol/L (Figura 20). O mesmo valor limiar foi encontrado para diagnosticar uma alta migração de neutrófilos para o tecido renal (2,65 mmol/L) 24 horas após induzir a sepse no modelo de CLP.

No geral, no tempo de 24 horas é possível perceber que a maioria dos parâmetros avaliados apresentou o valor de corte de 2,65 mmol/L de lactato (Figura 20). Assim, a mensuração do lactato no tempo de 24 horas pode ser utilizada no diagnóstico, pois, facilita compreender a sua progressão da doença, identificar um animal com sepse ou choque séptico, indicando até mesmo danos celulares irreversíveis e falência múltipla dos órgãos.

Figura 20: Valor de corte de lactato utilizados para o diagnóstico de colapso cardíaco, hepático e alta migração de neutrófilos para o tecido renal em 24 horas.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Valores de corte de lactato capaz de prever uma disfunção cardíaca, hepática e alta migração de neutrófilos para o tecido renal. Eixo Y indica os valores de lactato.

Embora a redução da temperatura tenha sido sugerida como um marcador eficaz para avaliar a gravidade da doença e prever a morte em modelo de sepse experimental em camundongos (MAI et al., 2018), não encontramos uma diferença significativa em nenhum dos tempos avaliados. Não temos uma explicação clara, mas isso concorda com estudos anteriores que mostram que ratos têm maior capacidade de manter sua temperatura (ZOLFAGHARI et al., 2013; THOMAS-RÜDDEL et al. 2021). Além disso, não houve um controle rígido da temperatura ambiente o que pode ter aumentado a variabilidade exigindo uma amostra maior para se detectar alguma diferença entre os grupos. Por fim, a mensuração da temperatura foi realizada por meio de instrumento não invasivo, que se por um lado proporciona praticidade para o experimentador e um menor desconforto para o animal, por outro lado, é mais suscetível a erros podendo aumentar a variabilidade na mensuração. Então, é recomendado o uso de instrumentos mais precisos em outros estudos que tenham como objetivo principal avaliar a temperatura como marcador.

Embora os animais estejam hipotensos, não observamos taquicardia nestes animais. Todavia, a frequência cardíaca foi avaliada apenas em 24 horas após a indução da sepse. Podemos considerar que o aumento da frequência cardíaca (taquicardia) pode ter acontecido antes mesmo de 24 horas, e que no momento avaliado os animais podem estar já entrando em colapso cardíaco. Concordando com isso, um estudo utilizando o modelo de sepse induzida por injeção intraperitoneal de pasta cecal em ratos, mostrou que ocorre um aumento na frequência cardíaca durante as primeiras horas e que este aumento serve de preditor de mortalidade (RUDIGER et al.,2018). Não obstante, para uma melhor compreensão da função cardíaca seria necessário a avaliação de parâmetros como a fração de ejeção ou débito cardíaco que devido às limitações técnicas não foram realizadas neste trabalho.

Embora a uréia seja um marcador muito utilizado para avaliar a função renal (HOU et al., 2019), não encontramos diferença entre os grupos. No entanto, é importante lembrar que avaliamos estes marcadores em um único momento, logo, um aumento nos níveis de uréia pode acontecer em momentos mais tardios após a CLP.

Nosso estudo tem algumas limitações, como o número pequeno de animais e variabilidade interlaboratorial, assim, diferenças nos valores de lactato podem ser encontradas. Além disso, os animais foram avaliados apenas por um curto período de tempo (24 horas), talvez a avaliação dos parâmetros após 24 horas seria útil para um valor de lactato capaz de prever mortalidade. A mensuração de marcadores não invasivos como procalcitonina, proteína c reativa (PCR) poderiam ser utilizados para prever mais facilmente disfunções sistêmicas.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, o lactato plasmático revelou ser um excelente biomarcador de prognóstico para disfunção sistêmica na sepse experimental, facilitando distinguir os animais saudáveis e sépticos e estabelecer valores de corte de lactato capazes de prever um colapso cardiovascular e hepático.

Em resumo, mostramos que o valor de lactato de 2,45 mmol/L durante as 6 horas prediz fortemente o colapso cardiovascular no modelo CLP. O valor de corte de 2,25 mmol/L de lactato (medido 6 horas após induzir a sepse experimental) prediz uma disfunção hepática. O valor de corte de 2,25 mmol de lactato (medido 6 horas após induzir a sepse experimental) é capaz de prever uma alta migração de neutrófilos para o tecido renal. O valor de corte de 2,65 mmol/L de lactato (medido 12 horas após induzir a sepse experimental) prediz um colapso cardiovascular, disfunção hepática e uma alta migração de neutrófilos para o tecido renal. O valor de corte de 2,65 mmol/L de lactato (medido 24 horas após induzir a sepse experimental) diagnostica um colapso cardiovascular, disfunção hepática e uma alta migração de neutrófilos para o tecido renal.

Sendo assim, o lactato pode ser facilmente medido a partir da veia da cauda do rato, permitindo a discriminação da gravidade da sepse. Com base nos valores de corte de lactato, é possível identificar precocemente o nível de severidade da sepse reduzindo a variabilidade dentro do grupo no modelo CLP melhorando a reprodutibilidade e translação dos dados.

REFERÊNCIAS

- ADEVA-ANDANY, M. et al. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. **Mitochondrion**, v. 17, p. 76–100, 2014.
- ANNANE, D. et al. A global perspective on vasoactive agents in shock. **Intensive Care Medicine**, v. 44, n. 6, p. 833–846, 2018.
- ARFARAS-MELAINIS, A. et al. Heart failure and sepsis: practical recommendations for the optimal management. **Heart Failure Reviews**, v. 25, n. 2, p. 183–194, 2020.
- ARINA, P.; SINGER, M. Pathophysiology of sepsis. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 34, n. 2, p. 77–84, 2021.
- ARNOLD, R. C. et al. Multicenter study of early lactate clearance as a determinant of survival in patients with presumed sepsis. **Shock**, v. 32, n. 1, p. 35–39, 2009.
- BAKKER, J.; POSTELNICU, R.; MUKHERJEE, V. Lactate. **Critical Care Clinics**, v. 36, n. 1, p. 115–124, 2020.
- BECHER, T. et al. The evolution of activated protein C plasma levels in septic shock and its association with mortality: A prospective observational study. **Journal of Critical Care**, v. 47, p. 41–48, 2018.
- BEESELEY, S. J. et al. Septic Cardiomyopathy. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 4, p. 625–634, 2018.
- BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal Models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 10, p. 854–865, 2005.
- CAMPION, M.; SCULLY, G. Antibiotic Use in the Intensive Care Unit: Optimization and De-Escalation. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 33, n. 12, p. 647–655, 2018.
- CECCONI, M. et al. Sepsis and septic shock. **The Lancet**, v. 392, n. 10141, p. 75–87, 2018.
- CERTO, M. et al. Lactate modulation of immune responses in inflammatory versus tumour microenvironments. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 3, p. 151–161, 2021.
- CHEN, Y. et al. Effect of continuous blood purification on immunity and endothelial cell function in patients with sepsis. v. 35, n. 2, p. 212–216, 2023.
- CHIU, C.; LEGRAND, M. Epidemiology of sepsis and septic shock. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 34, n. 2, p. 71–76, 2021.

CHOUSTERMAN, B. G.; SWIRSKI, F. K.; WEBER, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 5, p. 517–528, 2017.

DOLMATOVA, E. V et al. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications. *Cardiovascular Research*, v. 117, n. 1, p. 60–73, 1 jan. 2021.
FAIX, J. D. Biomarkers of sepsis. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 50, n. 1, p. 23–36, 2013.

FENG, J. et al. Catheterization of the Carotid Artery and Jugular Vein to Perform Hemodynamic Measures, Infusions and Blood Sampling in a Conscious Rat Model. **Journal of Visualized Experiments**, n. 95, 2015.

FERNANDES, D. et al. Angiotensin II receptor type 1 blockade improves hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock. **European Journal of Pharmacology**, v. 897, p. 173953, 2021.

FILHO, R. R. et al. Blood Lactate Levels Cutoff and Mortality Prediction in Sepsis—Time for a Reappraisal? a Retrospective Cohort Study. **Shock**, v. 46, n. 5, p. 480–485, nov. 2016.

GARCIA-ALVAREZ, M.; MARIK, P.; BELLOMO, R. Sepsis-associated hyperlactatemia. **Critical Care**, v. 18, n. 5, p. 503, 2014.

GOTTS, J. E.; MATTHAY, M. A. Sepsis: pathophysiology and clinical management. **BMJ**, p. i1585, 2016.

GREGORIUS, J.; BRENNER, T. Pathophysiologie der Sepsis. *AINS - Anästhesiologie · Intensivmedizin · Notfallmedizin · Schmerztherapie*, v. 58, n. 01, p. 13–27, 2023.

HARAZIM, M. et al. Blood urea nitrogen - independent marker of mortality in sepsis. **Biomedical Papers**, v. 167, n. 1, p. 24–29, 15, 2023.

HERNÁNDEZ, R. M.; RUEDA, F. R. Biomarkers as Prognostic Predictors and Therapeutic Guide in Critically Ill Patients: Clinical Evidence. **Journal of personalized medicine**, v. 13, n. 1, p. 333, 2023.

HOLMES, C. L. Vasoactive drugs in the intensive care unit. **Current Opinion in Critical Care**, v. 11, n. 5, p. 413–417, out. 2005.

HOTCHKISS, R. S. et al. Sepsis and septic shock. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16045, 2016.

JOFFRE, J. et al. Endothelial Responses in Sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 202, n. 3, p. 361–370, 1, 2020.

JONES, T. W. et al. Sepsis With Preexisting Heart Failure: Management of Confounding Clinical Features. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 9, p. 989–1012, 2021.

KEMPKER, J. A.; MARTIN, G. S. A global accounting of sepsis. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 168–170, 2020.

KIM, Y. A. et al. Early blood lactate area as a prognostic marker in pediatric septic shock. **Intensive care medicine**, v. 39, n. 10, p. 1818–1823, 2013.

KOÇAK TUFAN, Z.; KAYAASLAN, B.; MER, M. COVID-19 and Sepsis. **TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES**, v. 51, n. SI-1, p. 3301–3311, 2021.

KOOZI, H.; LENGQUIST, M.; FRIGYESI, A. C-reactive protein as a prognostic factor in intensive care admissions for sepsis: A Swedish multicenter study. **Journal of Critical Care**, v. 56, p. 73–79, 2020.

KUHLMANN, M. K. et al. New Experimental Model of Acute Renal Failure and Sepsis in Rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 18, n. 6, p. 477–485, 1994.

LAMBDEN, S. et al. The SOFA score—development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 374, 2019.

LANGENBERG, C. et al. Renal blood flow in sepsis. **Critical care**, v. 9, n. 4, p. 363–374, 2005.

LELUBRE, C.; VINCENT, J.-L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 417–427, 2018.

LI, J.-L. et al. Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 6, p. 2410–2422, 2018.

LIAO, M.-H. et al. Possible biomarkers of early mortality in peritonitis-induced sepsis rats. **Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 1, p. 362–370, 2013.

LINS, A. N. S. et al. Perfil epidemiológico das internações por sepse no Brasil entre 2017 e 2021. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e592111134048, 2022.

LOBO, S. M. et al. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 31, n. 1, 2019.

MAI, S. H. C. et al. Body temperature and mouse scoring systems as surrogate markers of death in cecal ligation and puncture sepsis. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 6, n. 1, p. 20, 2018.

MARTIN ARSANIOS, D. et al. Actualización en sepsis y choque séptico: nuevas definiciones y evaluación clínica. **Acta Colombiana de Cuidado Intensivo**, v. 17, n. 3, p. 158–183, 2017.

MOK, G. et al. Macrocirculatory and Microcirculatory Endpoints in Sepsis Resuscitation. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 12, p. 1385–1391, 30 2021.

NAPOLITANO, L. M. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. **Surgical Infections**, v. 19, n. 2, p. 117–125, 2018.

NGUYEN, H. B. et al. Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock*. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 8, p. 1637–1642, 2004.

NISHIBORI, M. Novel aspects of sepsis pathophysiology: NETs, plasma glycoproteins, endotheliopathy and COVID-19. **Journal of pharmacological sciences**, v. 150, n. 1, p. 9–20, 2022.

NOWAK, R. et al. Noninvasive Hemodynamic Monitoring in Emergency Patients with Suspected Heart Failure, Sepsis and Stroke: The Premium Registry. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 15, n. 7, p. 786–794, 2014.

OPAL, S. M.; WITTEBOLE, X. Biomarkers of Infection and Sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 36, n. 1, p. 11–22, 2020.

OSUCHOWSKI, M. F. et al. Circulating Cytokine/Inhibitor Profiles Reshape the Understanding of the SIRS/CARS Continuum in Sepsis and Predict Mortality. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1967–1974, 2006.

PEERAPORN RATANA, S. et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. **Kidney International**, v. 96, n. 5, p. 1083–1099, 2019.

POOL, R.; GOMEZ, H.; KELLUM, J. A. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 34, n. 1, p. 63–80, 2018.

POSTON, J. T.; KOYNER, J. L. Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ*, p. k4891, 2019.

PULIDO, J. N. et al. Clinical Spectrum, Frequency, and Significance of Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 87, n. 7, p. 620–628, 2012.

PURCAREA, A.; SOVAILA, S. Sepsis, a 2020 review for the internist. **Romanian Journal of Internal Medicine**, v. 58, n. 3, p. 129–137, 1 2020.

RAJKUMARI, N. et al. Procalcitonin as a Predictor of Sepsis and Outcome in Severe Trauma Patients: A Prospective Study. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 5, n. 02, p. 100–108, 2013.

REMICK, D. G. et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. Cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 13, n. 2, p. 110–116, 2000.

RHODES, A. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 3, p. 304–377, 18 mar. 2017.

RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–36, 2009.

RUDD, K. E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200–211, jan. 2020.

RUDIGER, A. et al. Heart rate elevations during early sepsis predict death in fluid-resuscitated rats with fecal peritonitis. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 6, n. 1, p. 28, 2018.

RUSSELL, J. A.; RUSH, B.; BOYD, J. Pathophysiology of Septic Shock. **Critical Care Clinics**, v. 34, n. 1, p. 43–61, 2018.

SALOMÃO, R. et al. Sepsis: evolving concepts and challenges. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, 2019.

SATTERWHITE, L.; LATHAM, H. Fluid Management in Sepsis Hypotension and Septic Shock. **Chest**, v. 158, n. 4, p. 1319–1320, 2020.

SCHIERWAGEN, C.; BYLUND-FELLENIS, A.-C.; LUNDBERG, C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 23, n. 3, p. 179–186, 1990.

SCHISTERMAN, E. et al. Optimal cut-point and its corresponding Youden index to discriminate individuals using pooled blood samples. **Epidemiology**, v. 16, p. 73–81, 2005.

SCHWARZ, C. E.; DEMPSEY, E. M. Management of Neonatal Hypotension and Shock. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 25, n. 5, p. 101121, 2020.

SERGI, C. et al. Cardiovascular dysfunction in sepsis at the dawn of emerging mediators. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 153–160, 2017.

SHANKAR-HARI, M. et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock. **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 775, 2016.

SHAPIRO, N. Early Restrictive or Liberal Fluid Management for Sepsis-Induced Hypotension. **New England Journal of Medicine**, v. 388, n. 6, p. 499–510, 2023.

SHRUM, B. et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 233, 2014.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801, 2016.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SRZIĆ, I.; VIŠNJA NESEK ADAM; DARINKA TUNJIĆ PEJAK. Sepsis definition: what's new sepsin the treatment guidelines. **Acta clínica Croatica**, v. 61, n. 1, p. 67–72, 2022.

STRATTON, L.; BERLIN, D. A.; ARBO, J. E. Vasopressors and Inotropes in Sepsis. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 35, n. 1, p. 75–91, 2017.

SUN, J. et al. Gut-liver crosstalk in sepsis-induced liver injury. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 614, 2020.

TOSCANO, M. G.; GANEA, D.; GAMERO, A. M. Cecal Ligation Puncture Procedure. **Journal of Visualized Experiments**, n. 51, 2011.

VASSILIOU, A. G. et al. Endothelial Damage in Acute Respiratory Distress Syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8793, 2020.

VILLAR, J. et al. Clinical and biological markers for predicting ARDS and outcome in septic patients. **Scientific Reports**, v. 22702, 2021.

WACHARASINT, P. et al. Normal-Range Blood Lactate Concentration in Septic Shock Is Prognostic and Predictive. **Shock**, v. 38, n. 1, p. 4–10, 2012.

WALLEY, K. R. Sepsis-induced myocardial dysfunction. **Current Opinion in Critical Care**, v. 24, n. 4, p. 292–299, 2018.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, v. 29, n. 2, p. 189–201, 1980.

WOLFERTZ, N. et al. Epidemiology, management, and outcome of infection, sepsis, and septic shock in a German emergency department (EpiSEP study). **Frontiers in Medicine**, v. 9, 2022.

WOŹNICA, E. et al. Liver dysfunction in sepsis. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 27, n. 4, p. 547–552, 2018.

XIA ZF, W. GS.; ZHONGHUA SHAO SHANG ZA ZHI. Role of cytokines in sepsis and its current situation of clinical application. **Chinese journal of burns**, v. 35, n. 1, p. 3–7, 2019.

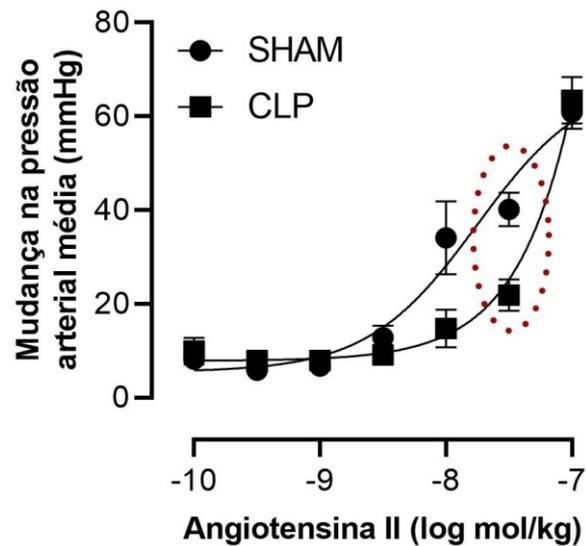
ZOU, W. et al. Repeated Blood Collection from Tail Vein of Non-Anesthetized Rats with a Vacuum Blood Collection System. **Journal of Visualized Experiments**, n. 130, 2017.

Zhai X, Yang Z, Zheng G, et al. Lactate as a potential biomarker of sepsis in a rat cecal ligation and puncture model. *Mediators Inflamm*. 2018, n.83522727, 2018.

Zhai X, Yang Z, Zheng G, et al. Lactate as a potential biomarker of sepsis in a rat cecal ligation and puncture model. **Mediators Inflamm**. n.83522727, 2018.

ANEXO I:

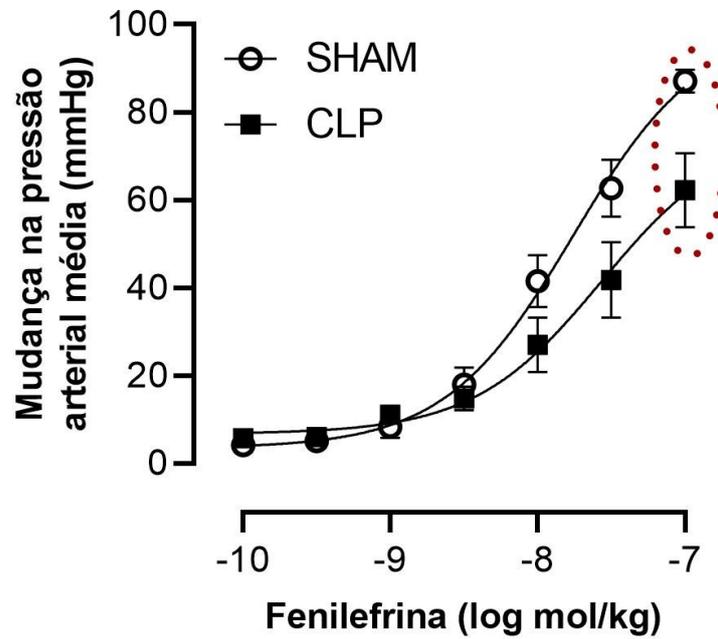
Curvas de dose-resposta de angiotensina II.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Resposta vasopressora à angiotensina II. Vinte e quatro horas após a ligadura e punção cecal (CLP), os animais foram preparados para registrar a pressão arterial média e injetadas doses crescentes de angiotensina II. O círculo vermelho pontilhado no gráfico indica a dose escolhida (30 pmol/kg, para angiotensina) para análise da curva ROC. O valor de P foi de 0,0039.

ANEXO II:

Curvas de dose-resposta de fenilefrina.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023). Resposta vasopressora à fenilefrina. Vinte e quatro horas após a ligadura e punção cecal (CLP), os animais foram preparados para registrar a pressão arterial média e injetadas doses crescentes de fenilefrina. O círculo vermelho pontilhado no gráfico indica a dose escolhida (100 nmol/kg para fenilefrina) para análise da curva ROC. O valor de P foi de 0,0003.