

# SÍNDROME DE DISFUNÇÃO DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS INDUZIDA POR SEPSE: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

*Sepsis inducing syndrome of multiple organ dysfunction: an experimental study in rats*

João Batista de Area **LIMA**, Thelma Larocca **SKARE**, Osvaldo **MALFAIA**, Jurandir Marcondes **RIBAS-FILHO**,  
Tiago **MICHAELIS**, Fernanda Marcondes **RIBAS**, Rodrigo de Almeida Coelho **MACEDO**

Trabalho realizado no Instituto de Pesquisas Médicas do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba / Faculdade Evangélica do Paraná - Curitiba, PR, Brasil.

**RESUMO – Racional** - A principal causa de morte em pacientes com sepse em cirurgia é a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos. Assim, modelos experimentais que simulem alterações orgânicas da sepse em humanos são necessários. **Objetivo**- Apresentar dois modelos que induzem a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e comparar as alterações induzidas por inoculação endovenosa de 36UE de lipopolissacarídeo ou célula viável de *Escherichia coli*, em relação à: mortalidade e sobrevivência; nível de lipopolissacarídeo; liberação de fator de necrose tumoral alfa; alterações hematológicas e das funções hepática e renal. **Método** - Este estudo teve duração de sete dias e utilizou-se nele 50 ratos Wistar machos, divididos em três grupos: controle, lipopolissacarídeo e *Escherichia coli*. Os grupos experimento eram inoculados e separados em dois subgrupos, com inoculação a cada 24 ou 48 horas. No sétimo dia eram procedidas coletas de sangue e análise histopatológica de fígado, rins e pulmões. **Resultados** - Houve sobrevivência de dez animais no grupo controle; zero no bacteriano de 24 horas e seis no de 48 horas; dez no lipopolissacarídeo de 24 horas e seis no de 48 horas. Nos grupos experimentais, os níveis de lipopolissacarídeo, fator de necrose tumoral alfa, leucócitos, plaquetas, bastonetes e as alterações renais e hepáticas foram superiores ao grupo controle. Houve alterações histopatológicas no grupo bacteriano. **Conclusão** - Os dois modelos de sepse induziram síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, contudo a administração de 36UE de endotoxina a cada 48 horas pode ser utilizada com vantagens sobre os demais por não induzir morte em número significativo durante o período de sete dias.

**DESCRITORES** - Sepse. Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos. Modelos de sepse. Lipopolissacarídeo. *Escherichia coli*.

## Correspondência:

João Batista de Area Lima,  
e-mail: jobalclinica@bol.com.br

Fonte de financiamento: não há  
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 17/12/2010  
Aceito para publicação: 25/01/2011

**HEADINGS** - Sepsis. Multiple organ dysfunction syndrome. Sepsis models. Lipopolysaccharide. *Escherichia coli*.

**ABSTRACT - Background** - The leading cause of death in patients with sepsis in surgery is syndrome of multiple organ dysfunction. Thus, experimental models that simulate organic changes of sepsis in humans are required. **Aim** - To present two models that induce the syndrome of multiple organ dysfunction and to compare, the changes induced, by intravenous injection of lipopolysaccharide or cell 36UE of viable *Escherichia coli* in relation to mortality and survival, level of lipopolysaccharide, release of tumor necrosis factor alpha ; hematological, liver and kidney function. **Method** - The study lasted seven days and it was used on it 50 male Wistar rats divided into three groups: control, lipopolysaccharide and *Escherichia coli*. The experimental groups were inoculated and divided into two subgroups, with inocuation with 24 or 48 hours. On the seventh day were proceeded blood collection and histopathologic analysis of liver, kidneys and lungs. **Results** - There was a survival of ten animals in the control group; zero in bacteria group of 24 hours and six in 48 hours; ten of lipopolysaccharide in 24 hours and six in 48 hours. In the experimental groups, levels of endotoxin, tumor necrosis factor alpha, leukocytes, platelets, renal and liver levels were higher than the control group. There were histopathological changes in the bacterial group. **Conclusion** - The two models of sepsis induced multiple organ dysfunction syndrome; yet the administration 36UE endotoxin every 48 hours could be utilized in advantage over the other for not induce death in significant numbers during the period of seven days.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos, os avanços nas áreas da biologia celular e molecular facilitaram o entendimento dos fatores envolvidos na sepse, ficando claro tanto o papel da agressão bacteriana como a resposta inflamatória do hospedeiro.

O estudo das bactérias e de seus efeitos deletérios no organismo humano teve grande avanço no final do século XIX, quando os bacteriologistas passaram a estudar as substâncias excretadas por estes micro-organismos. Estas substâncias, denominadas exotoxinas, tinham como ponto comum a inativação pelo aquecimento. Nesse período descobriu-se que uma substância liberada pela lise bacteriana era resistente ao calor e se mostrava capaz de produzir efeitos biológicos importantes como febre e choque circulatório. Esta substância foi denominada de endotoxina<sup>1</sup>. Elas são compostas por açúcares polimerizados, complexos de ácidos graxos e proteínas. Como a porção proteica não tem atuação patológica, o termo lipopolissacarídeo (LPS) passou a ser utilizado como sinônimo de endotoxina<sup>1,2,9</sup>. Ela é um componente da membrana externa da parede de bactérias gram-negativas e composta por uma porção polissacarídica e uma lipídica<sup>1,2,9</sup>.

A porção polissacarídica encontra-se dividida em duas partes. A mais externa com propriedades antigênicas, induz à formação de anticorpos específicos contra esta parte da molécula<sup>1,5,9</sup>. A mais interna, o core<sup>5</sup>, por sua vez é dividido em core externo e core interno. No interno existem moléculas do ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosônico (Kdo) que são encontradas somente no LPS e podem ser ponto para futuras formas de terapia<sup>1</sup>.

A porção lipídica, conhecida como lipídio A, possui pouca variação estrutural e encontra-se dentro da membrana externa da bactéria, e é responsável pela toxicidade das bactérias gram-negativas<sup>9,12</sup>. O lipídio A é constituído de glucosamina, fosfato e ácido graxo. Para que ocorra a sua liberação da parede bacteriana, é necessário que a molécula se torne ativa, fenômeno que acontece quando as bactérias morrem ou se multiplicam<sup>1</sup>.

Dentre os muitos modelos propostos para reproduzir em animais os sinais de sepse vistos em humanos estão: inoculação de bactéria ou endotoxina intravascular ou intraperitoneal, ligadura e perfuração de ceco, infecção de tecidos moles, modelos de pneumonia e de meningite<sup>13</sup>. Como centenas de diferentes modelos de sepse têm sido descritos, fica claro que não existe um modelo único, perfeito e apropriado para todas as aplicações. Se o ideal para a sepse existisse deveria ter os seguintes critérios<sup>8</sup>: 1. capacidade de prever os resultados positivos e negativos de novos agentes terapêuticos; 2. baixo custo; 3. ser reproduzível dentro de um determinado laboratório; 4. ser reproduzível em diferentes

laboratórios; 5. ser humanitário; 6. ser capaz de prever o ponto de mortalidade; 7. reproduzir os parâmetros hemodinâmicos, hematológicos e bioquímicos de maneira similar ao observados na sepse humana.

Os modelos de sepse que utilizam a administração endovenosa de LPS ou de bactéria representam modelos sem um foco infeccioso prévio<sup>8,10</sup>, com vantagens em relação ao controle preciso da dose de infusão e reprodutibilidade. Têm a desvantagem, no entanto, de induzir sepse de forma muito rápida, ao contrário da sepse em humanos, onde o processo se inicia lentamente<sup>21</sup>. As principais falhas apontadas nos modelos de sepse são o uso de animais jovens, sem nenhuma doença associada, induzida por uma única bactéria geralmente gram-negativa. Isso é o contrário do que ocorre na maioria dos casos de sepse humana, onde os pacientes são idosos, com doenças associadas, onde nem sempre se conhece o agente causal ou às vezes pode ser causada por mais de uma bactéria, fungos ou vírus<sup>6</sup>.

Assim, para auxiliar no estudo da sepse, este estudo tem por objetivos apresentar dois modelos que induzem a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e comparar as alterações induzidas por inoculação endovenosa de 36UE de lipopolissacarídeo ou célula viável de *Escherichia coli* em relação à mortalidade e sobrevivência, nível de lipopolissacarídeo, liberação de fator de necrose tumoral alfa, alterações hematológicas e das funções hepática e renal.

## MÉTODOS

Utilizaram-se 50 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), machos, da linhagem Wistar, com idades entre 123 a 138 dias e pesos de 236,2±11,4 g que foram separados em grupos (Figura 1)

Grupos	Subgrupos		Procedimentos
	Inóculo	N	
Lipopolissacarídeo	LPS-1	10	Inoculação a cada 24 horas por 7 dias
	LPS-2	10	Inoculação a cada 48 horas por 7 dias
<i>Escherichia coli</i>	EC-1	10	Inoculação a cada 24 horas por 7 dias
	EC-2	10	Inoculação a cada 48 horas por 7 dias
Controle		10	Sem manipulação

FIGURA 1 - Desenho do estudo

Os animais foram separados em grupos de cinco, alojados em caixas de polipropileno desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1%, contendo cepilho esterilizado por autoclavagem - trocados a cada 48 horas -, em temperatura controlada entre 19 a 23°C, sob ciclo de iluminação automaticamente regulado a cada 12 horas em ambiente com exaustão forçada.

Receberam ração específica para a espécie (Nuvilab - Nuvital®) e água acidificada a pH 4,0 ad libitum. Durante este período foram procedidos exames parasitológicos de fezes, inspeção da pelagem para investigação de ectoparasitas, sendo excluídos os animais portadores. Após a seleção permaneceram por duas semanas sob regime de observação antes de serem iniciados os experimentos.

#### Preparação do inóculo de LPS

Ela seguiu a metodologia proposta por Morrison e Leive<sup>19</sup> e Fink<sup>8</sup>, sendo a solução preparada diariamente, duas horas antes da inoculação. Era feita a pesagem do LPS Sigma Chemical® (artigo L-4130 lote 30k4063), liofilizado, obtido da cepa 0111:B4 de *Escherichia coli* procedente da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil em frascos de vidro esterilizado e apirogênico mantido em geladeira entre 4°C e 8°C, conforme a necessidade diária do cronograma de inoculações. A seguir solubilizava-se as alíquotas de LPS contidas nos frascos de vidro em 10 ml de solução fisiológica imediatamente antes de sua inoculação nos animais; separava-se uma alíquota da solução para dosagem de endotoxina pelo método LAL (Lymulus Amebocyte Lisates), para a padronização do inóculo que era diluído para conter 36 unidades endotóxicas/ml (UE/ml).

Após a identificação da caixa e de cada rato, era feita a sedação deles em campânula fechada sob saturação de Isoflurano (Forane® Abbott) tomando-se a precaução de não induzir anestesia. Após isso, era realizada a inoculação de 36 UE da solução de LPS com seringa descartável para insulina, na veia dorsal peniana do rato, sendo realizada uma leve pressão no local da punção para evitar refluxo e observá-los por 30 minutos.

Todos os animais foram avaliados diariamente, sempre no mesmo horário, anotando em protocolo os seguintes parâmetros: prostração, piloereção, blefarite sanguinolenta, hematuria, morte. Em caso de morte, procedia-se necrópsia sendo coletadas amostras de rins, fígado e pulmões para avaliação histopatológica (hematoxilina-eosina).

#### Preparação do inóculo de *Escherichia coli*

Seguiu-se a metodologia proposta por Isenberg<sup>15</sup>, sendo a suspensão preparada diariamente duas horas antes da inoculação. Realizava-se a semeadura de *Escherichia coli* 0111:B4 (ATCC 12015 - procedente da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil) em ágar infusão de cérebro e coração, 24 horas antes de sua preparação; incubava-se por 18 horas em estufa a 37°C; duas horas antes do procedimento de inoculação, eram coletadas as colônias desenvolvidas no meio de cultura e suspensas em solução fisiológica em tubo de ensaio; comparava-se a turvação obtida pela suspensão preparada com os tubos de cloreto de bário através da escala nefelométrica de Mac-Farland; definia-se a concentração; procedia-se a diluição, em outro tubo de ensaio com solução fisiológica, até obtenção da

concentração de 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônias (10<sup>6</sup> UFC/ml); separava-se uma alíquota da suspensão de *Escherichia coli* para dosagem de endotoxina pelo método LAL; semeava-se novamente a *Escherichia coli* em ágar infusão de cérebro e coração, sendo ela incubada para o dia seguinte. Após a obtenção desta dosagem, ela era diluída para conter 36 unidades endotóxicas /ml (UE/ml).

#### Inoculação

Após verificação da identificação da caixa e de cada rato, era feita a sedação deles em campânula fechada sob saturação de Isoflurano (Forane® Abbott) tomando a precaução de não induzir anestesia. Após a sedação procedia-se à inoculação de LPS ou de 36UE da solução de *Escherichia coli* com seringa descartável para insulina, na veia dorsal peniana do rato, sendo feita leve pressão no local da punção para evitar refluxo. Observou-se o local da inoculação por 30 minutos.

#### Coleta de sangue

Ao sétimo dia do experimento os ratos eram anestesiados da mesma forma e realizava-se punção intra-cardíaca sendo coletado sangue em seringa de 20 ml e agulha 25x8 mm esterilizadas e apirogênicos em volume de no mínimo 10 ml, suficiente para a indução de parada cárdio-respiratória. O sangue era separado em alíquotas mínimas de 2 ml em diferentes tubos para as seguintes aferições: 1. contagem de leucócitos, bastonetes e plaquetas; 2. provas de função hepática - bilirrubina direta, bilirrubina total, TGO e TGP; 3. provas de função renal - uréia e creatina; 4. dosagens de endotoxina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e 5. determinação do tempo de ação da protrombina (TAP).

Para a dosagem de endotoxinas, foi empregado o método do Lymulus Amebocyte Lisate (Endosafe®1073), descrito por Bertók<sup>4</sup>, que tem por princípio a capacidade dos amebócitos extraídos do crustáceo *Limulus polyphemus* gelificarem-se na presença de endotoxinas (LPS). Esta gelificação é consequência da ativação da enzima zimogênica serin-protease, em presença de cátions divalentes que produzem o coagulogênio do *Limulus*.

Para a dosagem imunoenzimática dos níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) empregou-se a técnica imunoenzimática quantitativa<sup>23</sup>, na qual um anticorpo monoclonal específico anti-TNF $\alpha$  é fixado em placa de Terazaki para posterior captura do antígeno TNF $\alpha$ . Foi empregado o conjunto de reativos Biotra Tumor Necrosis Factor Elisa System (Amersham Pharmacia code RPN 2718®).

#### Avaliação estatística

Os resultados foram comparados pelo método de ANOVA através do teste de Tukey-Kramer. Para as comparações entre grupos utilizou-se o teste de t de Student. Em ambas as avaliações adotou-se p<0,05 como índice mínimo de significância estatística.

**TABELA 1** - Demonstrativo da sobrevivência e mortalidade entre os animais de cada subgrupo durante os sete dias de observação

Grupos	Subgrupos	Total de ratos	Acompanhamento diário														Total de sobreviventes no sétimo dia
			1º dia		2º dia		3º dia		4º dia		5º dia		6º dia		7º dia		
			M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	
LPS	LPS-1	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	2	8	2	6	6
	LPS-2	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	10
<i>Escherichia coli</i>	EC-1	10	0	10	0	10	6	4	2	2	2	0	+	+	10	0	0
	EC-2	10	0	10	0	10	4	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6
Controle		10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	10

LPS= lipopolissacarídeo; M= mortos, S= sobreviventes, (+) sem sobreviventes

## RESULTADOS

A Tabela 1 demonstra a ocorrência de mortalidade entre os animais de cada subgrupo, através de acompanhamento diário até o sétimo dia.

Após a morte, os animais foram necropsiados sendo coletadas amostras de rins, fígado e pulmões para avaliações histopatológicas.

Os que receberam inóculos de LPS e evoluíram para a morte apresentavam apenas prostração e piloereção. Na necropsia não apresentavam alterações nos rins e no fígado e os pulmões apresentavam-se congestos.

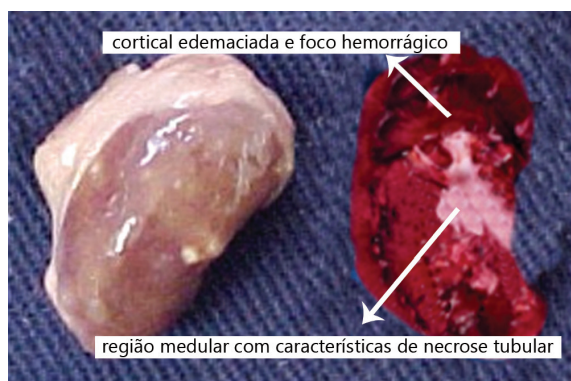
Os ratos que receberam inoculações de *Escherichia coli* apresentavam-se prostrados em momentos anteriores à morte, com piloereção e blefarite sanguinolenta. Na avaliação macroscópica de rim deste grupo (subgrupo EC-1) evidenciou-se área cortical edemaciada e focos hemorrágicos na região medular com características de necrose tubular (Figura 2A).

Microscopicamente observou-se congestão tubular e infiltrado inflamatório (Figura 2B).

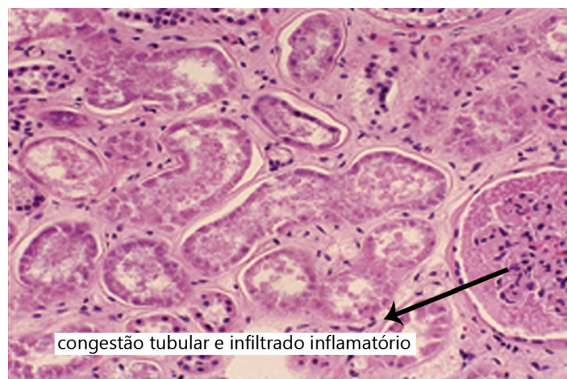
Na Figura 2, ainda, observam-se a macro e a microscopia do pulmão dos mesmos animais, sendo destacada na macroscopia a intensa hemorragia (2C), confirmada pela microscopia (2D).

As avaliações relatadas a seguir referem-se aos grupos LPS-1, LPS-2, EC-2 e Controle, não foram procedidas no grupo EC-1 devido a que todos os ratos morreram durante o experimento.

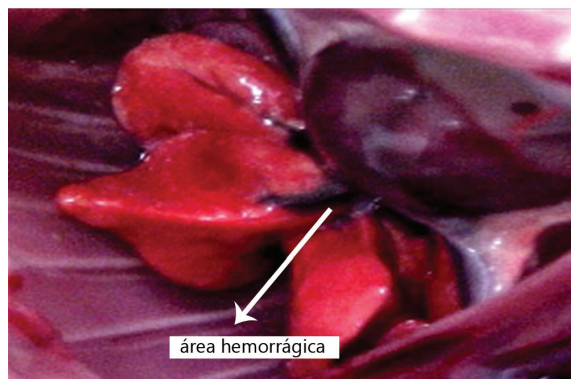
Assim, no sétimo dia de observação a inoculação de 36 UE de células viáveis de *Escherichia coli* a cada 24 horas (EC-1) não permitiu a sobrevivência dos ratos até o sétimo dia do estudo, e a inoculação a cada 48 horas (EC-2) permitiu a sobrevivência de seis dos dez ratos inoculados. A mesma quantidade de endotoxina administrada a cada 48 horas (LPS-2) possibilitou a sobrevivência dos dez ratos, e nos casos de inoculação a cada 24 horas (LPS-1) houve sobrevivência de seis dos dez ratos.



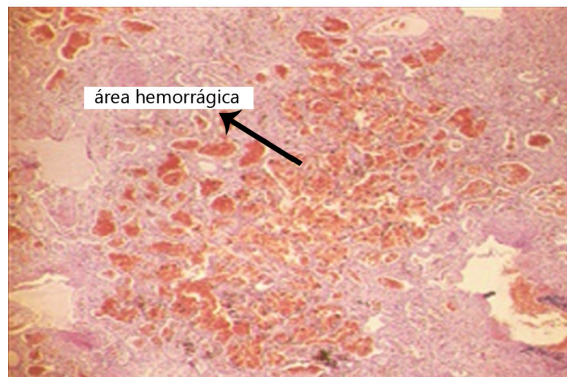
A: Macroscopia



B: Coloração HE x100



C: Macroscopia



D: Coloração HE x40 - Necrose pulmonar

**FIGURA 2** - Macroscopia e microscopia de rim (A e B) e pulmão (C e D) de rato do grupo EC-1 (*Escherichia coli*)

### Avaliações hematológicas

Foi observada leucocitose nos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli* (Tabela 2), pois as contagens de leucócitos nestes grupos foram maiores que no grupo controle. Entre os grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli* não houve diferenças significativas entre as contagens de leucócitos.

As contagens de plaquetas demonstraram plaquetopenia significativa nos subgrupos inoculados com LPS e *Escherichia coli*, pois foram menores que no grupo controle. Entre os grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli* não houve diferenças significativas entre as contagens de plaquetas.

As contagens de bastonetes demonstraram desvio nuclear à esquerda significativa nos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli*, pois foram maiores que no grupo controle. Entre os subgrupos inoculados com LPS-1 e LPS-2 não houve diferença significativa. A contagem do subgrupo EC-2 foi significativamente menor do que a contagem nos subgrupos LPS-1 e LPS-2.

**TABELA 2** - Resultados encontrados nas avaliações hematológicas, hepáticas e renais

Avaliações hematológica		LPS-1	LPS-2	EC-2	Controle
Contagens de leucócitos (x10 <sup>3</sup> /ml)		12,7±3,1	9,9±1,4	10,38±2,9	5,4±1,1
Contagens de plaquetas (x10 <sup>3</sup> /ml)		67,8±34,0	41,4±22,1	39,1±24,2	381,4±83,7
Contagens de bastonetes (%)		29,5±7,7	22,5±9,7	12,2±5,3	0,2±0,6
Subgrupos comparados		Contagem de Leucócitos	Contagem de Plaquetas	Contagem de Bastonetes	
Controle	X LPS-1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
	X LPS-2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
	X EC-2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
LPS-1	X LPS-2	0,0267	0,0784	0,1553	
	X EC-2	0,2040	0,1227	0,001	
LPS-2	X EC-2	0,6786	0,8472	0,032	
Avaliações hepática		LPS-1	LPS-2	EC-2	Controle
Dosagens de TGO (UI/L)		509,7±131,1	766,3±214,1	588,0±136,4	152,5±60,4
Dosagens de TGP (UI/L)		293,8±100,8	315,6±112,8	194,5±23,7	66,1±21,4
Dosagens de BT (mg/dl)		2,0±0,3	1,9±0,3	2,3±0,5	0,3±0,1
Avaliação do TAP (s)		19,3±0,8	17,2±1,6	19,4±1,7	15,9±0,7
Subgrupos comparados		TGO	TGP	BT	BT
Controle	X LPS-1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	X LPS-2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	X EC-2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
LPS-1	X LPS-2	0,0196	0,7039	0,9230	0,9230
	X EC-2	0,3344	0,0405	0,2424	0,2424
LPS-2	X EC-2	0,0906	0,0226	0,1513	0,1513
Avaliações renais		LPS-1	LPS-2	EC-2	Controle
Dosagens de uréia (mg/dl)		141,8±39,4	193,2±22,6	97,8±14,4	66,1±17,3
Dosagens de creatinina (mg/dl)		1,7±0,43	2,0±0,55	1,2±0,51	0,3±0,12
Subgrupos comparados		Dosagens de Ureia		Dosagens de Creatinina	
Controle	X LPS-1	<0,0001		<0,0001	
	X LPS-2	<0,0001		<0,0001	
	X EC-2	0,0021		0,0001	
LPS-1	X LPS-2	0,0047		0,2762	
	X EC-2	0,0278		0,0889	
LPS-2	X EC-2	<0,0001		0,0109	

### Avaliação da função hepática

Foi observado aumento acentuado das dosagens da transaminase glutâmica-oxalacética nos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli*, em relação ao grupo controle. Houve diferença significativamente maior do LPS-2 em relação a LPS-1. Não houve diferença significativa entre os subgrupos inoculados com LPS-1 e EC-2 e entre LPS-2 e EC-2.

Foi observado aumento acentuado das dosagens de transaminase glutâmico-pirúvica nos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli*, em relação ao grupo controle. Houve diferença significativa maior entre LPS-1 e EC-2 e entre LPS-2 e EC-2.

Foi observado aumento acentuado das dosagens de bilirrubina total nos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli*, em relação ao grupo controle. Entre os subgrupos inoculados com LPS ou *Escherichia coli* não foram observadas diferenças significativas.

Foi observado aumento das avaliações do TAP nos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli*, em relação ao grupo controle. Entre os subgrupos inoculados o subgrupo LPS-1 foi maior que no LPS-2 e este menor que o subgrupo EC-2.

Entre as avaliações da função hepática procedidas destacaram-se as determinações de TGO para diferenciar os grupos LPS-1 e LPS-2; a TGP entre LPS-1 e EC-2, e LPS-2 e EC-2; o TAP entre LPS-1 e LPS-2 e LPS-2 e EC-2 (Tabela 2).

### Avaliação da função renal

Foi observado aumento acentuado das dosagens de uréia nos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli*, em relação ao grupo controle. Houve aumento significativo dos subgrupos LPS-1 e LPS-2 em relação ao subgrupo EC-2, e do LPS-2 em relação ao LPS-1.

Foi observado aumento significativo das dosagens de creatinina nos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli*, em relação ao grupo controle. Houve aumento significativo do subgrupo LPS-2 em relação ao subgrupo EC-2 (Tabela 2).

### Dosagens de endotoxina

No grupo controle não houve detecção de endotoxina, não sendo possível comparar este resultado aos dos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli*. Entre os subgrupos não houve diferença significativa das dosagens, mostrando que os níveis séricos de endotoxina foram similares (Tabela 3).

Assim, quanto à indução de endotoxemia, os três subgrupos demonstraram níveis superiores ao grupo controle e não houve diferença significativa entre a administração de endotoxina a cada 24 ou 48 horas (subgrupos LPS-1 e LPS-2 respectivamente) ou ainda células viáveis de *Escherichia coli* a cada 48 horas (EC-2).

### Dosagens de fator de necrose tumoral alfa

Foi observado aumento acentuado das dosagens de TNF- $\alpha$  nos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli*, em relação ao grupo controle. Entre os subgrupos inoculados, o LPS-1 mostrou valores significativamente maiores que o subgrupo EC-2 (Tabela 3).

**TABELA 3** - Demonstrativo das dosagens de endotoxina (UE/ml) e fator de necrose tumoral alfa (PG/ml)

Avaliações		LPS-1	LPS-2	EC-2	Controle
Dosagens de Endotoxina (UE/ml)		0,098 $\pm$ 0,064	0,109 $\pm$ 0,060	0,117 $\pm$ 0,060	-
Subgrupos comparados		Dosagens de Endotoxina			
LPS-1	X LPS-2	0,7191			
	X EC-2	0,5994			
LPS-2	X EC-2	0,8062			
Avaliações		LPS-1	LPS-2	EC-2	Controle
Dosagens de TFN alfa (pg/ml)		0,117 $\pm$ 0,060	1.047,30 $\pm$ 354,88	895,83 $\pm$ 204,01	32,40 $\pm$ 7,06
Subgrupos comparados		Dosagens de TFN alfa			
Controle	X LPS-1	<0,0001			
	X LPS-2	<0,0001			
	X EC-2	<0,0001			
LPS-1	X LPS-2	0,1910			
	X EC-2	0,0086			
LPS-2	X EC-2	0,3594			

A administração de 36UE de endotoxina a cada 24 horas (LPS-1) não diferiu da administração a cada 48 horas (LPS-2), por sete dias.

## DISCUSSÃO

No presente estudo optou-se pelo modelo de indução endovenosa de sepse por ser ele de metodologia simples e de fácil reprodutibilidade. Apresenta como desvantagem a não presença de um foco de infecção, o que acarreta em instalação do processo séptico de início abrupto. Para tentar contornar a não presença de um foco de manutenção da infecção, foi escolhida a utilização de forma de indução mantida durante sete dias, com doses a cada 24 horas ou a cada 48 horas e não aquela feita somente inoculação única, em grande dose como em outros experimentos<sup>9</sup>. Procurou-se assim, uma maneira de simular a sequência de fatos que ocorrem secundários a um foco de infecção. O material utilizado, no caso do uso de LPS continha dose de 36 UE/ml, obtida com solução de lipopolissacarídeo a 2 mg/kg, o que é considerado dose baixa, existindo na literatura relato do uso de até 10 mg/kg<sup>18</sup>.

No caso do uso de *Escherichia coli*, a suspensão também foi padronizada de forma a conter a mesma quantidade, ou seja, de 36 unidades endotóxicas por mililitros. Desta maneira, os dois sistemas utilizados, o de LPS e o com EC continham a mesma concentração de toxinas o que foi feito com intuito de permitir que esta variável não fosse causa de viés de interpretação.

Ao serem analisadas as metodologias empregadas

na indução de sepse nos grupos LPS e EC, observou-se que os dois grupos representam modelos controlados, facilmente reproduzíveis, mas que o grupo EC necessitou de várias etapas para preparação do inóculo. Essa bactéria precisa ser semeada em meio ágar cérebro e coração por 24 horas, coletada e submetida à determinação da concentração em UFC/ml e, posteriormente diluída para que a solução contivesse 36 UE/ml. O preparo para o grupo LPS foi metodologicamente mais simples, pois o procedimento requeria basicamente pesagem e solubilização no momento da inoculação. Todavia, o grupo LPS apresentou como desvantagem custo mais elevado.

Sabe-se que a sepse pode ser desencadeada por inoculação de células viáveis ou somente do componente celular efetivamente responsável pela eclosão da sepse, o lipopolissacarídeo<sup>20</sup>. Essas duas formas de indução estão refletidas nos modelos ora testados. No realizado por inoculação do micro-organismo vivo, optou-se pela utilização da bactéria *Escherichia coli*, porque as gram-negativas são as principais bactérias relacionadas com infecção e sepse em humanos.

Para identificação do sucesso quanto à indução de sepse nos animais foram dosados marcadores como o nível de endotoxina e a liberação TNF- $\alpha$ . Akamine<sup>1</sup> relata que a endotoxina está relacionada ao desencadeamento dos processos fisiopatológicos básicos no choque séptico e que a injeção de quantidades variáveis de lipopolissacarídeo é capaz de produzir choque séptico e morte em animais de experimentação.

Além dos parâmetros clínicos, hemodinâmicos e laboratoriais convencionais, diversos estudos têm demonstrado ser possível caracterizar a SRIS através da presença ou ausência de determinados marcadores biológicos associados ao processo inflamatório e infeccioso<sup>22</sup>. Na verdade, uma característica marcante e invariável da SRIS é a indução e liberação de diversas citocinas e proteínas de fase aguda, tanto pró quanto anti-inflamatórias, cujos níveis séricos se elevam rapidamente durante a resposta inflamatória. Hubl, et al.<sup>14</sup>, mostrou que o TNF- $\alpha$  e seu receptor TNF-R5 (receptor 5 do fator de necrose tumoral alfa) estão consistentemente aumentados na sepse. Segundo van Der Pollt e Sauerwein<sup>24</sup>, o TNF- $\alpha$  ele é tido como mediador importante na sepse a partir das seguintes evidências: é a primeira citocina que aparece na sepse; sua administração em animais induz síndrome com as características da sepse e o tratamento com anticorpo anti-TNF $\alpha$  protege contra os efeitos letais do LPS em vários modelos animais.

Em relação ao nível de endotoxina não houve detecção no grupo controle, não sendo possível comparar este resultado aos dos inoculados com LPS e *Escherichia coli*. Houve aumento nos grupos LPS e EC e entre os subgrupos não houve diferença significativa das dosagens, mostrando que os níveis séricos de

lipopolissacarídeo foram similares para caracterizar a sepse em todos os grupos.

Foi observado aumento acentuado das dosagens de TNF- $\alpha$  nos grupos LPS e *Escherichia coli*, em relação ao grupo controle, mostrando que os dois grupos estavam em sepse por este marcador. Portanto os dois modelos se mostraram eficientes em apresentar elevação tanto de TNF- $\alpha$  quanto de endotoxina.

Entre os ratos do EC-1 ocorreram seis mortes no terceiro dia, duas no quarto dia e duas no quinto dia. Entre os do subgrupo EC-2, (inoculação a cada 48 horas por sete dias), ocorreram quatro mortes no terceiro dia. Desta forma, destaca-se no terceiro dia de evolução, o maior número de mortes entre os ratos que receberam inóculos de *Escherichia coli*. Os que morreram no transcurso do estudo foram submetidos à necrópsia e avaliação histológica de órgãos vitais como fígado, rins e pulmões. Foram verificados os mesmos achados macroscópicos na necrópsia e na microscopia de rins, pulmões e fígado dos subgrupos EC-1 e EC-2.

Os dez ratos do subgrupo EC-1 e em quatro do EC-2, que morreram em sete dias, demonstraram alterações histopatológicas significativas. Nos rins observou-se edema, hemorragia, congestão e necrose tubular e ainda inflamação. No fígado havia congestão, hemorragia, edema e necrose. Nos pulmões verificou-se intensa hemorragia. Estes achados são compatíveis com SRIS, decorrente de infecção, principalmente por bactérias gram-negativas.

Nos ratos que receberam inóculos de LPS houve menor mortalidade que naqueles que receberam inóculos de *Escherichia coli* e somente no grupo LPS-1 (inoculação a cada 24 horas) houve duas mortes no sexto dia e outras duas no sétimo. Ao contrário do que se observou nos ratos inoculados com *Escherichia coli*, que apresentavam em momento anterior à morte prostração, piloereção e blefarite sanguinolenta, esses últimos evoluíram para a morte apresentando apenas prostração e piloereção.

Nos quatro ratos que morreram inoculados com LPS a cada 24 horas durante os sete dias, a necrópsia não demonstrava alterações nos rins e no fígado e os pulmões apresentavam-se congestos. A morte dos ratos deste grupo pode ser explicada por distúrbio de coagulação agudo, ou afecções cardíacas, sem evidências objetivas para sua confirmação, porém discutidas e confirmadas por Fink e Heard<sup>9</sup>, ao avaliarem a sepse induzida por infusão endovenosa de lipopolissacarídeo em ratos.

Em termos de sobrevivência dos ratos, destaca-se a diferença observada em termos de esquema de inoculação do subgrupo LPS-2, no qual os mesmos receberam 36 unidades endotóxicas a cada 48 horas por sete dias. Neste grupo não se observou mortalidade alguma. Outros grupos com menor taxa de mortalidade foram os de LPS-1 e EC-2, com seis sobreviventes cada.

No presente estudo ocorreu leucocitose em ambos os grupos, tanto nos ratos inoculados com LPS

como nos com *E. coli* e as contagens de bastonetes demonstraram desvio nuclear à esquerda. Conforme descrito<sup>3,24</sup>, em extensa revisão sobre mediadores na sepse experimental, a contagem das células brancas totais sanguíneas maior que 12.000/mm<sup>3</sup> ou menor que 4.000/mm<sup>3</sup> ou com mais de 10% de formas imaturas estão relacionadas com a instalação da síndrome da resposta inflamatória sistêmica na sepse, em conjunto com outros achados.

As contagens de plaquetas revelaram diminuição significantes, mas não ocorreu diferença significativa entre os grupos LPS e EC. Nos ratos em estudo, no momento anterior à morte, verificou-se blefarite sanguinolenta e na necrópsia foi encontrado congestão e hemorragia nos rins, fígado e pulmões, o que se justifica pela plaquetopenia significativa nos grupos LPS e EC.

A elevação da alanina aminotransferase e da aspartato aminotransferase é relativamente comum na sepse, podendo ser resultado de lesão hepática isquêmica ou pós re-perfusional, de toxicidade medicamentosa, de inflamação sistêmica ou de ação patogênica direta do agente infeccioso, sendo um sinal de sofrimento celular dos hepatócitos e, em alguns casos, de disfunção mitocondrial<sup>16,17</sup>.

A elevação da bilirrubina direta e das enzimas de membrana, como a gama glutamiltransferase e a fosfatase alcalina apontam para colestase inflamatória, medicamentosa ou obstrutiva. A elevação da bilirrubina indireta pode indicar hematopoiese ineficaz, hemólise microangiopática ou por efeito de drogas, aloimunização levando a anemia hemolítica auto-imune, desencadeamento de defeitos agudos da membrana eritrocitária subjacente, como a deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase, entre outros. Observou-se aumento acentuado das dosagens de bilirrubinas nos grupos inoculados com LPS e *Escherichia coli* em relação ao grupo controle. Entre os subgrupos inoculados com LPS ou *Escherichia coli* não foram observadas diferenças significantes. A disfunção hepática pode ocorrer em consequência à alteração direta do funcionamento da célula hepática ou por hipoperfusão tecidual. Ela pode acentuar a resposta inflamatória por diminuir a depuração de endotoxinas e/ou citocinas<sup>11</sup> e é traduzida por hiperbilirrubinemia com aumento da forma direta. Isto ocorre pela não excreção da bilirrubina conjugada no pólo sinusoidal.

O tempo de atividade da protombina é frequentemente utilizado como marcador da função hepática e o seu aumento foi observado nos grupos LPS e *Escherichia coli* em relação ao grupo controle.

Nos últimos anos, a sepse tem se tornado a principal causa de insuficiência renal aguda, principalmente no ambiente de terapia intensiva. Em estudo prospectivo, sua incidência foi de 19% em pacientes sépticos, de 23% naqueles com sepse grave e de 51% em pacientes com choque séptico<sup>7</sup>. Ela é geralmente um dos componentes da síndrome

de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas, e a sua presença afeta adversamente o prognóstico. Uréia e creatinina são usadas como marcadores da função renal. Foi observado aumento das dosagens de uréia e creatinina nos grupos LPS e *Escherichia coli* em relação ao grupo controle.

No presente estudo verificou-se que os ratos estavam em sepse pelas alterações nos marcadores TNF- $\alpha$  e lipopolissacarídeos. Os indicadores da presença da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos incluíram o achado de disfunção em dois ou mais órgãos, como fígado, rins, pulmões e, também, na coagulação evidenciando que houve indução dessa síndrome nos ratos com sepse.

## CONCLUSÕES

Os dois modelos de sepse induziram síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, contudo a administração de 36UE de endotoxina a cada 48 horas pôde ser utilizada com vantagens por não induzir morte em número significativo durante o período de sete dias.

## REFERÊNCIAS

- Akamine N, Fernandes Junior CJ, Wey SB, Knobel E. Choque séptico e mecanismos de agressão tecidual. In: Knobel E. ( editor.) *Conduitas no paciente grave*, 2ª edição, São Paulo: Atheneu 1999, p.17-46.
- Araújo-Filho I, JácomeI DT, Rêgo ACM, Azevedo IM, Egito EST, Medeiros AC. Efeito da sinvastatina na sepse abdominal de ratos diabéticos. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2010, 37(1) 31-8.
- Benjamin CF. Atualização sobre mediadores e Modelos experimentais de sepse. *Medicina, Ribeirão Preto*, 34:18-26, jan./mar. 2001.
- Bertók L. role of endotoxins and bile acids in the pathogenesis of septic circulatory shock. *Acta Chir Hung* 1997. 36: 33-36.
- Crowley SR. The pathogenesis of septic shock. *Heart Lung*. 1996 Mar-Apr;25(2):124-34
- Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med.* 2004 May;32(5 Suppl):S219-22.
- Figueiredo LFP, Borges LA, Rasslan S. Consenso brasileiro de sepse - Parte III. *RBTI* 2004; 16(4):185-256.
- Fink M. Animal models of sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome. *Surg Res* 2001; 63: 875-91.
- Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990 Aug;49(2):186-96..
- Freise H, Brückner UB, Spiegel HU. Animal models of sepsis. *J Invest Surg.* 2001 Jul-Aug;14(4):195-212.
- Freudenberg MA, Galanos C. Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *Int Rev Immunol.* 1990;6(4):207-21.
- Galanos C, Freudenberg MA. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology.* 1993 Apr;187(3-5):346-56.
- Garrido AG, Figueiredo LFP, Silva ME. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cir. Bras.* 2004; 19: 82-88.
- Hübl W, Wolfbauer G, Streicher J, Andert S, Stanek G, Fitzal S, Bayer PM. Differential expression of tumor necrosis factor receptor subtypes on leukocytes in systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 1999 Feb;27(2):319-24.
- Isenberg HD. *Essential procedures for clinical microbiology.* American Society for Microbiology. Washington. 1998, p.95-101
- Lundberg JS, Perl TM, Wiblin T, Costigan MD, Dawson J, Nettleman MD, Wenzel RP. Septic shock: an analysis of outcomes for patients with onset on hospital wards versus intensive care units. *Crit Care Med.* 1998 Jun;26(6):1020-4.
- Macri MM, Matias JEF, Souza CJF, Nicoluzzi JEL, Caron PE, Repka JCD. Influência do pneumoperitônio nas funções hepática e renal e na liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo experimental de endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. *Arq Bras Cir Dig.* 2009, 22(4): 206-11.
- Matsumoto T, Dolgor B, Ninomiya K, Bandoh T, Yoshida T, Kitano S. Effect of CO2 pneumoperitoneum on the systemic and peritoneal cytokine response in a LPS-induced sepsis model. *Eur Surg Res.* 2001;33(2):71-6.
- Morrison DC, Leive L. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 prepared by two extraction procedures. *J Biol Chem.* 1975 Apr 25;250(8):2911-19.
- Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg.* 2001 Jan;88(1):22-30.
- Piper RD, Cook DJ, Bone RC, Sibbald WJ. Introducing Critical Appraisal to studies of animal models investigating novel therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1996 Dec;24(12):2059-70.
- Silva E, Othero JB, Pinheiro C. Consenso Brasileiro de Sepse - Parte I. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2004 ; 16(2):96-118.
- Sprong RC, Aarsman CJ, van Oirschot JF, van Asbeck BS. Dimethylthiourea protects rats against gram-negative sepsis and decreases tumor necrosis factor and nuclear factor kappaB activity. *J Lab Clin Med.* 1997 Apr;129(4):470-81.
- van der Poll T, Sauerwein HP. Tumour necrosis factor-alpha: its role in the metabolic response to sepsis. *Clin Sci (Lond).* 1993 Mar;84(3):247-56.