



Evento: XXIX Seminário de Iniciação Científica

ESCORE MURINO DE SEPSE ADAPTADO¹

ADAPTED MURINE SEPSIS SCORE¹

Felipe Rafael Passos², **Lucas Machado Sulzbacher**³, **Maicon Machado Sulzbacher**⁴,
Thiago Gomes Heck⁵, **Matias Nunes Frizzo**⁵.

¹ Trabalho vinculado ao projeto do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Atenção Integral à Saúde UNIJUÍ/UNICRUZ.

² Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF); Acadêmico de Fisioterapia UNIJUÍ, bolsista PROBIC/FAPERGS

³ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF); Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS).

⁴ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF); Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS).

⁵ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF); Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), Professor (a) do Departamento de Ciências da Vida/ UNIJUÍ.

RESUMO

O Escore Murino de sepse tem sido usado em estudos de sepse para descrever a gravidade da doença e avaliar o impacto das terapias, no entanto carece da adição de parâmetros clínicos e laboratoriais como glicemia, temperatura e peso, os quais podem ser preditores de gravidade da sepse. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a inclusão de parâmetros clínicos e laboratoriais no modelo Murino de Sepse, bem como sua aplicabilidade na avaliação precoce e monitoramento da sepse. Para tanto foram utilizados 15 camundongos C57BL divididos em grupos Controle e Sepse. A sepse foi induzida pela administração de solução fecal autógena a 20% (1 mg / g). Os animais foram monitorados quanto a glicemia, temperatura retal e peso corporal antes e 4h, 12h e 24h após a administração da solução fecal. Em conclusão, demonstramos que a inclusão de variáveis como glicemia, temperatura e peso corporal melhoram o monitoramento da sepse, em modelos animais, pela diferenciação precoce entre animais saudáveis e doentes, como também na progressão da severidade da sepse.

Palavras-chave: Modelo animal. Sepse. Glicemia. Temperatura Corporal. Peso Corporal.

INTRODUÇÃO

A sepse se caracteriza como uma "disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção" e choque séptico como um subconjunto de sepse em que as anormalidades circulatórias e celulares/metabólicas subjacentes são profundas o suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade (SINGER et al., 2016; REINHART et al., 2017). Para a OMS (2020) a sepse mata 11 milhões de pessoas a cada ano, muitas delas crianças e dentre os sobreviventes milhões desenvolvem algum tipo de incapacidade. O primeiro relatório global da Organização Mundial da Saúde sobre sepse conclui que o esforço para lidar com milhões de mortes e incapacidades devido à sepse é dificultado por graves lacunas no conhecimento, especialmente em países de baixa e média renda (WHO, 2020).

Na sepse, a resposta imune é caracterizada por sinais de inflamação excessiva e supressão imunológica, cuja extensão varia entre os indivíduos (VAN DER POLL et al., 2017). O tratamento de pacientes sépticos depende fortemente do monitoramento dos sinais vitais e os pacientes com maior risco de morte podem ser identificados por meio de pontuações de alerta precoce, que documentam mudanças na temperatura corporal, frequência



respiratória, frequência cardíaca, pressão arterial, nível de consciência do paciente e parâmetros laboratoriais (CORFIELD et al., 2014). Nesse sentido Shrum et al. (2014) construíram o Murine Sepsis Score (MSS) com o objetivo de determinar a evolução do quadro da sepse em modelo animal. O MSS consiste em observar e categorizar o nível de consciência, atividade, comportamento, resposta a estímulos, frequência respiratória e qualidade dos movimentos respiratórios, no entanto o escore não abrange todos os parâmetros clínicos identificados no quadro da sepse. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a inclusão de parâmetros clínicos e laboratoriais no modelo Murino de Sepse, bem como sua aplicabilidade na avaliação precoce para o monitoramento e prognóstico na sepse.

METODOLOGIA

Delineamento experimental

Foram utilizados 15 camundongos da linhagem C57BL/6 com 90 a 150 dias, provenientes do Biotério da UNIJUÍ. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: Controle (n = 7), e submetido à sepse por peritonite (Sepse, n = 8). Para o protocolo de peritonite foi utilizada solução fecal 20% (200mg/mL) preparada com fezes frescas em cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, e administrada via intraperitoneal na dose de 5µL/g (1 mg/g), enquanto os animais do grupo Controle receberam NaCl 0,9% (5µL/g). Os animais foram monitorados quanto à glicemia, temperatura retal e Escore Murino de Sepse (EMS), antes (Tempo zero) e 4, 12 e 24 horas após a indução da sepse. Com esses dados em conjunto se avaliou o EMSA (Quadro 2). O EMS (Escore Murino de Sepse) consistiu na observação e categorização do nível de consciência, atividade, comportamento, resposta a estímulos, frequência respiratória e qualidade dos movimentos respiratórios, com a pontuação de 0 a 4 para cada item. O detalhamento de cada item a ser avaliado se encontra no Quadro 1.



Quadro 1. Escore Murino de Sepsis (EMS).

| Escore (pontos) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aparência | Pelagem com aspecto liso | Focos pelos eretos | Piloereção na maior parte das costas | Piloereção pode ou não estar presente o animal com aparência de "inchado" | Piloereção pode, ou não estar presente, o camundongo parece emagrecido |
| Nível de consciência | Ativo | Ativo, mas evita ficar de pé | Atividade visivelmente mais lenta | So se move quando provocado, os movimentos são um tremor | Permanece sem resposta quando provocado, com possível tremor |
| Atividade | Quantidade normal de atividade: comer, beber, escalar, correr, lutar | Atividade ligeiramente suprimida. Se move em volta do fundo da gaiola | Atividade suprimida. Esta parada com movimentos de investigação ocasionais | Não atividade | Nenhuma atividade. Apresenta tremores, particularmente nas pernas traseiras |
| Resposta a estímulos | Responde imediatamente ao estímulo auditivo ou ao toque | Lento ou nenhuma resposta ao estímulo auditivo; Resposta forte ao toque (move para escapar) | Nenhuma resposta ao estímulo auditivo; resposta moderada ao toque (move alguns passos) | Nenhuma resposta ao estímulo auditivo; resposta suave ao toque (sem locomoção) | Nenhuma resposta ao estímulo auditivo. Pouca ou nenhuma resposta ao toque. Não pode se endireitar se for empurrado |
| Aspecto dos olhos | Abertos | Olhos não totalmente abertos, possivelmente com secreções | Olhos pelo menos meio fechados, possivelmente com secreções | Olhos meio fechados ou mais, possivelmente com secreções | Olhos fechados ou leitosos |
| Frequência respiratória | Respiração normal | Respiração ligeiramente diminuída | Respiração moderadamente reduzida (taxa na faixa superior de quantificação por olho) | Respiração severamente reduzida (0,5 s entre respirações) | Respiração extremamente reduzida (> 1 s entre respirações) |
| Qualidade respiratória | Normal | Breves períodos de respiração trabalhada | Trabalhada, sem ofego | Trabalhou com suspiros intermitentes | Gaspeando |

Quadro 2. Escore murino de sepsis adaptado (EMSA)

| Escore (pontos) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------------------|---------|-------------|------------|-----------|------|
| Temperatura corporal (°C) | 36 - 38 | >38 | <36 - ≥38 | <36 - ≥34 | <34 |
| Glicemia casual (mg/dL) | ≥145 | ≤145 - ≥122 | <122 - ≥88 | <88 - >40 | ≤40 |
| Perda de peso corporal relativa (%) | 0% - 5% | 5% - 10% | 10% - 15% | 15% - 20% | >20% |

Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIJUÍ sob parecer número 048/2016.

Procedimentos

Aferição de glicemia, temperatura retal e peso corporal: A glicemia foi aferida por punção na parte distal da cauda (~5µL) utilizando-se glicosímetro OptiumXceed®. A temperatura retal foi mensurada com termômetro digital, e a medida de peso corporal através de balança semi-analítica.

Análise estatística: A verificação da distribuição dos dados foi realizada com o teste de Kolmogorov-Smirnov e a análise estatística foi realizada por ANOVA de uma e duas vias, com medidas repetidas, seguida do pós-teste de bonnferroni. Também foram realizadas análises de correlação de Pearson e Spearman, no programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Para nível de significância estatística foi considerado valor de 5% (P<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados quanto à avaliação do EMS (Figura 1A), Peso corporal (Figura 1B), Temperatura (Figura 1C) e Glicemia (Figura 1D) ao longo do estudo. O grupo sepsis aumentou significativamente a pontuação no EMS em relação ao grupo controle (*P < 0,0001) no tempo 12h e 24h após a indução da sepsis (Figura 1A). Em relação ao peso corporal e à temperatura dos animais (Figura 1B e 1C) no tempo 24h o grupo sepsis



apresentou uma redução significativa em relação ao controle (*P < 0,0002 e *P < 0,0001 respectivamente). Na figura 1D o grupo sepse apresentou uma glicemia significativamente menor que o grupo controle nos tempos 4h, 12h e 24h (*P < 0,0001).

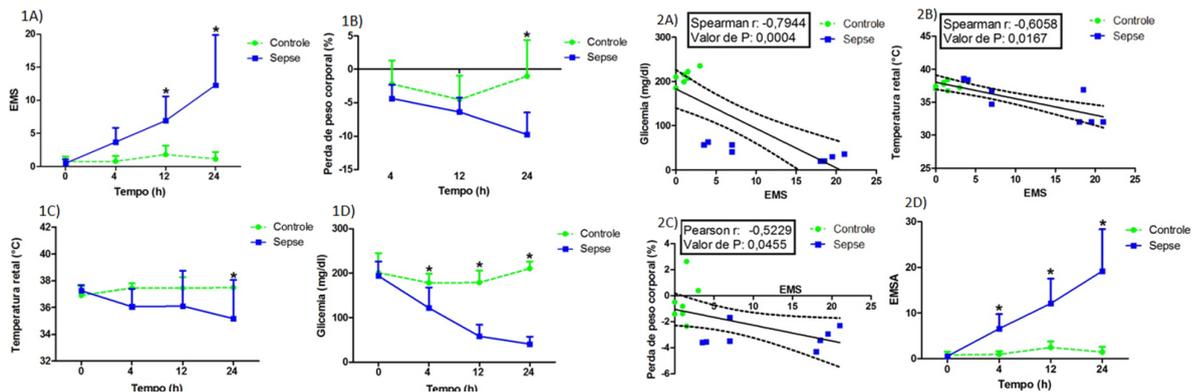


Figura 1A: Aferição de escore murino de sepse (EMS) (*P< 0,0001; F_{1,52}= 31,43). **Figura 1B:** Perda de Peso Corporal (%) (*P< 0,0002; F_{1,39}= 16,95). **Figura 1C:** Temperatura retal (°C) (*P< 0,0001; F_{1,130} = 8,23). **Figura 1D:** Glicemia (mg/dl) (*P< 0,0001; F_{1,52} = 124,3) em 24 horas após a indução de sepse com solução fecal 20% (1 mg/g). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Bonferroni considerando nível significativo de 5%. **Figura 2A:** Correlação entre Glicose (mg/dl) e Escore Murino de Sepse (EMS) (P=0,0004; r= -0,7944). **Figura 2B:** Correlação entre Temperatura retal (°C) e Escore Murino de Sepse (EMS) (P=0,0167; r=-0,6058). **Figura 2C:** Correlação entre Peso Corporal (%) e Escore Murino de Sepse (EMS) (P=0,0455; r= -0,5229). **Figura 2D:** Aferição do Escore Murino de Sepse Adaptado (EMSA) (*P< 0,0001; F_{1,52} = 58,39). Correlação de Spearman (Figura 2A e 2B), Correlação de Pearson (Figura 2C) e ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni. Considerando nível significativo de 5% para todas as análises.

As variáveis de Glicemia (mg/dL), Temperatura (°C) e Peso corporal (%) apresentaram correlações negativas com o EMS nas 24h após a indução da sepse (Figura 2A, 2B e 2C). Foi verificada uma forte correlação negativa entre Glicemia e EMS (P= 0,0004; r=-0,79), correlações negativas moderadas entre Temperatura Corporal e EMS (P= 0,0167; r=-0,60) e Peso Corporal e EMS (P=0,0455; r=-0,52). Através do conjunto desses dados foi desenvolvido o Escore Murino de Sepse Adaptado (EMSA) que compõe além das variáveis do EMS original os dados de Glicemia, Temperatura e Peso Corporal que mostrou com a pontuação significativamente elevada em relação ao controle nos tempos 4h (P=0,05), 12h e 24h (Ambos P=0,0001) (Figura 2D). O EMSA agregou parâmetros quantitativos às medidas observacionais do EMS, o que permitiu uma avaliação indireta dos sistemas cardiovascular (temperatura retal) e metabólico (glicemia e peso corporal), que são imprescindíveis para o prognóstico da sepse, uma vez que no estágio inicial da sepse, a isquemia e a hipóxia podem ativar a via glicolítica, o que resulta em consumo acentuado de glicose e, eventualmente, um nível baixo de glicose no sangue (LI et al., 2018; PIZARRO; TROSTER, 2007).

Reduções na temperatura corporal, pressão arterial e frequência cardíaca (FC) são características clínicas importantes da sepse humana. Em modelo animal, essas características



foram encontradas na fase inicial da sepse. Temperatura corporal baixa, pressão arterial baixa e FC lenta reduzem a taxa metabólica e o suprimento de oxigênio, induzindo assim a hipóxia no corpo (TAO et al., 2008). Bhavani et al. (2018) e Young et al. (2012) demonstraram que a hipotermia (<36°C) associada a um aumento da taxa de mortalidade. Além disso, devemos considerar o efeito da sepse no peso corporal em camundongos jovens e velhos, Stortz et al. (2019) demonstraram que ambos os grupos tiveram reduções no peso corporal, assim como Auiwattanakul et al. (2019) destacaram que a perda de peso prediz a mortalidade em indivíduos internados em UTIs por sepse. Tais resultados demonstram a utilidade prognóstica das medições dinâmicas de temperatura e seus benefícios no controle da mortalidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão demonstramos que a inclusão de variáveis como glicemia, temperatura e peso corporal podem melhorar o monitoramento da sepse, em modelos animais, pela diferenciação precoce entre animais saudáveis e doentes, como também na progressão da severidade da sepse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUIWATTANAKUL S, et al. Effects of nutrition factors on mortality and sepsis occurrence in a multicenter university-based surgical intensive care unit in Thailand. *Nutrition*. 2019;58:94–9.
- BHAVANI S, CAREY K, et al. Association between temperature variability and mortality in hospitalized patients with infection[abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197A6060
- CORFIELD AR, et al. Scottish Trauma Audit Group Sepsis Steering G (2014) Utility of a single early warning score in patients with sepsis in the emergency department. *Emerg Med J* 31:482–487
- GRANGER JI, et al. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(7):1047-1057.
- LI, X. et al. Hsp70 suppresses mitochondrial reactive oxygen species and preserves pulmonary microvascular barrier integrity following exposure to bacterial toxins. *Front. Immunol.* 9 (2018).
- PIZARRO C, TROSTER EJ. Adrenal function in sepsis and septic shock Adrenal function in sepsis and septic shock. *J Pediatr*. 2007;83:155–62.
- REINHART, KD, RON K, NIRANJAN M, et al. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. *New England Journal of Medicine*.377 - 2017.
- SINGER M, DEUTSCHMAN CS, SEYMOUR CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) *JAMA*. 2016;315(8):801–810.
- SHRUM B, ANANTHA R V., XU SX, et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes*. 2014;7:1–11.
- STORTZ JA, et al. Old Mice Demonstrate Organ Dysfunction as well as Prolonged Inflammation, Immunosuppression, and Weight Loss in a Modified Surgical Sepsis Model. *Crit Care Med*. 2019;47(11):e919-e929.
- VAN DER POLL T, et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:407–420.
- World Health Organization (Genève: WHO; [2019 Feb 20].
- YOUNG PJ, et al. Early peak temperature and mortality in critically ill patients with or without infection. *Intensive Care Med*. 2012;38:437–444.