



Evento: XII Seminário de Inovação e Tecnologia

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS COMO BIOMARCADORES DA SEPSE EM CAMUNDONGOS¹

HEMATOLOGICAL PARAMETERS AS BIOMARKERS OF SEPSIS IN MICE

**Victória Luisa Da Rosa Ribeiro², Maicon Machado Sulzbacher³, Thiago Gomes Heck⁴,
Matias Nunes Frizzo⁵**

¹ Projeto desenvolvido dentro do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI através da bolsa de iniciação tecnológica e inovação da CNPq

² Bolsista de Iniciação tecnológica e inovação da CNPq; Estudante do curso de graduação em Medicina da UNIJUI.

³ Doutorando em Farmacologia pela Universidade Federal de Santa Maria.

⁴ Professor Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUI) e Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional (PPGMMC).

⁵ Professor Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS/UNICRUZ/UNIJUI).

INTRODUÇÃO

A sepse é uma infecção e inflamação sistêmica que ocasiona disfunção múltipla dos órgãos, caracterizada por um aumento agudo de 2 ou mais pontos no escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), indicando disfunção neurológica, cardíaca, hepática, renal, respiratória, hematológica (plaquetopenia e alteração nos parâmetros leucocitários) e imunológica (SEYMOUR et al., 2016). Segundo a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) a sepse acomete cerca de 49 milhões de pessoas anualmente, com uma mortalidade de 11 milhões destas (WHO, 2021).

O monitoramento do leucograma e plaquetograma são parâmetros hematológicos que refletem de forma rápida as modificações ocasionadas pelo processo infeccioso, e podem ser preditores do diagnóstico e gravidade do quadro de sepse (GUCYETMEZ; ATALAN, 2016). As modificações hematológicas da sepse podem ser observadas a partir de relações realizadas entre a contagem diferencial no leucograma, como a razão entre neutrófilo e linfócito (RNL), e ainda somadas à observação do plaquetograma, que juntamente com a avaliação entre a interação de linfócitos com plaquetas (razão entre plaquetas e linfócitos - RPL) podem ser biomarcadores da sepse em pacientes (DJORDJEVIC et al., 2018).

Deste modo, o presente relatório tem como objetivo avaliar os parâmetros hematológicos, em modelo experimental em camundongos, como biomarcadores preditivos da sepse.



METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados 14 camundongos da linhagem C57BL/6 com cerca de 90 dias, provenientes do Biotério da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ). Foram respeitados os princípios éticos, sendo o presente estudo aprovado pela CEUA-UNIJUÍ protocolo 008/2021. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, o grupo sepse (n=7) que recebeu injeção intraperitoneal de solução fecal 20% (1mg/g) para indução da sepse e o grupo controle (n=7) que recebeu injeção de solução fisiológica 0,9%.

O sangue foi acondicionado em tubo com anticoagulante (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos (5 µL de EDTA, para cada 500 µL de sangue). Para a determinação automatizada foi utilizado o analisador hematológico Micros 60 (Horiba), seguindo as recomendações do fabricante. Através desse equipamento foi possível obter os seguintes parâmetros: contagem total de leucócitos, contagem relativa e absoluta de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos), além da contagem de plaquetas, sendo realizadas as relações RPL e RNL. As amostras foram diluídas 1:2 com solução salina 0,9 % e realizadas em triplicata. Após, foram realizadas distensões hematológicas em lâmina, corados com coloração de Giensa May Grunwaldt e analisadas por profissional com experiência na área, para cada lâmina uma contagem de 100 células leucocitárias e avaliação morfológica eritróide e plaquetária).

- *Relação Plaqueta/ Linfócito (RPL)*: Calculada a partir da divisão da contagem de plaquetas pela contagem de linfócitos, expressos em mm³.

Para fazer a análise dos resultados utilizou-se a plataforma GraphPad. Os testes utilizados foram o teste T não pareado. E os resultados foram expressos com a média +- desvio padrão.

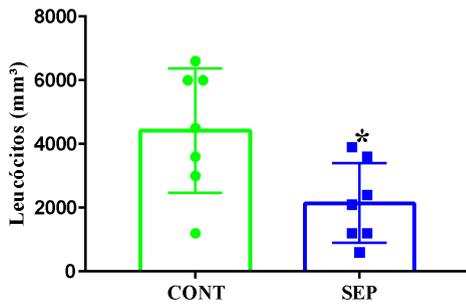
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da coleta de sangue por punção caudal após 24 horas da indução de sepse pode-se analisar alguns parâmetros hematológicos, dentre eles o leucograma e a relação plaquetas/linfócitos (RPL) dos animais pertencentes aos grupos controle e sepse.

O gráfico 1 representa a análise da contagem de leucócitos totais 24 horas após a indução da sepse a partir de injeção intraperitoneal de solução fecal 20% (1mg/g) (grupo

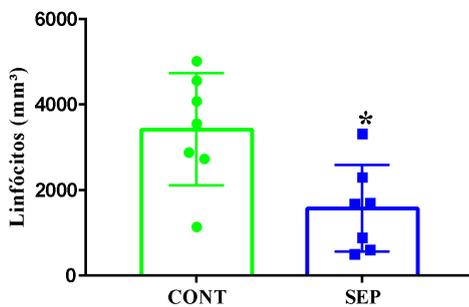


sepsis) ou de solução fisiológica (grupo controle). A partir dele pode-se perceber uma diferença significativa ($p < 0,023$) entre o grupo sepsis, que apresentou leucopenia, em relação ao grupo controle, os quais estavam com contagens leucocitárias que estavam em valores dentro dos intervalos de referência.



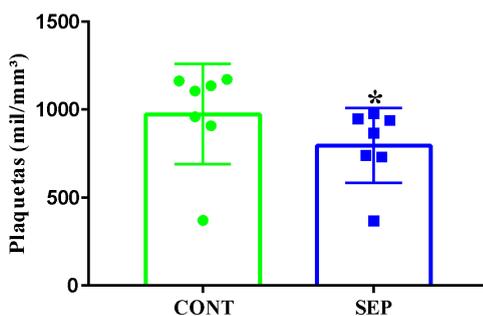
Legenda: Os resultados foram avaliados a partir do teste estatístico de Teste T não pareado. $*p < 0,023$. No gráfico, têm-se as médias + desvio padrão dos grupos sepsis e controle, bem como a identificação individual de cada animal. Grupo azul (sepsis, $n=7$) apresentando 2143+-1254. Grupo verde (controle, $n=7$) com 4414+-1950.

No gráfico 2 a seguir, apresenta-se a análise da contagem absoluta de linfócitos entre os grupos experimentais no momento da eutanásia, no qual os animais do grupo sepsis apresentaram linfopenia, enquanto que os linfócitos dos animais do grupo controle permaneceram dentro da normalidade.



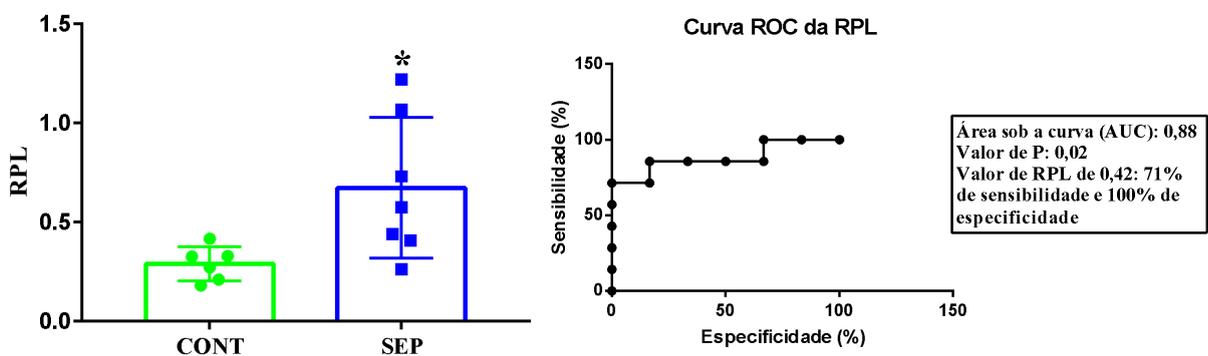
Legenda: Os resultados foram avaliados a partir do teste estatístico de Teste T não pareado. $*p < 0,023$. No gráfico, têm-se os valores das médias e dos desvios padrões dos grupos sepsis e controle, bem como a identificação individual de cada animal. Grupo azul (sepsis, $n=7$) apresentando 1570+-1023. Grupo verde (controle, $n=7$) com 3423+-1308.

O gráfico 3 representa a análise da contagem de plaquetas, na qual observamos que o grupo sepsis apresentou trombocitopenia significativa em relação aos valores dos animais do grupo controle, correlacionando-se com o consumo de plaquetas pela disfunção endotelial e coagulopatias da sepsis.



Legenda: Os resultados foram avaliados a partir do teste estatístico de Teste T não pareado. $*p < 0,023$. No gráfico, têm-se os valores das médias e dos desvios padrões dos grupos sepsis e controle, bem como a identificação individual de cada animal. Grupo azul (sepsis, $n=7$) apresentando 796,30+-212,6. Grupo verde (controle, $n=7$) com 974,6+-284,8.

No gráfico 4 apresentamos a análise dos resultados da relação plaquetas/linfócitos (RPL) dos animais do grupos sepse e do grupo, na qual demonstramos uma diminuição da RPL no grupo sepse ($p < 0,026$). Além disso, a RPL foi avaliada também através da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) demonstrada no gráfico 5, que demonstra a especificidade e a sensibilidade da utilização da RPL como biomarcador de sepse. Nele tem-se demonstrado a área sob a curva (AUC) de 0,88, que significa que em casos de sepse a RPL tem boa medida de separabilidade, uma vez que o valor AUC é próximo de 1,00.



Legenda: Os resultados foram avaliados a partir do teste estatístico de Teste T não pareado. $*p < 0,023$. No gráfico, têm-se os valores das médias e dos desvios padrões dos grupos sepse e controle, bem como a identificação individual de cada animal. Grupo azul (sepse, $n=7$) apresentando $0,67 \pm 0,36$. Grupo verde (controle, $n=7$) com $0,29 \pm 0,09$.

O modelo experimental em camundongos tem diferença na contagem diferencial dos leucogramas em relação aos humanos, uma vez que nos humanos encontra-se uma maior resposta neutrofílica que linfocitária em infecções bacterianas, enquanto que os camundongos têm resposta linfocitária (adaptativa) maior que a resposta inata dos neutrófilos (BARBOSA et al., 2017). Além disso, nas contagens leucocitárias, dentre elas a contagem de neutrófilos e a contagem de eosinófilos são utilizadas como preditores de sepse desde o início da década de 1990. A contagem de eosinófilos e a contagem de linfócitos associam-se com transtornos de estresse agudo, como trauma ou infecção. Assim, em alguns estudos, eosinófilos, linfócitos e a razão de contagem de neutrófilos-linfócitos foram utilizados como indicadores para o diagnóstico de sepse e desfecho da sepse (DE JAGER et al., 2010).

Na fisiopatologia da sepse, o quadro de síndrome da resposta inflamatória sistêmica tem como característica o número de leucócitos mais de 12 mil ou menor que 4 mil, logo, tanto a leucopenia quanto a leucocitose podem ser preditores da sepse. Além disso, a linfopenia e trombocitopenia também são úteis na identificação da sepse (GUCYETMEZ; ATALAN, 2016). Na endotoxemia, sabe-se que os neutrófilos aumentam enquanto que os



linfócitos diminuem na circulação. Hawkins et al. (2006) mostraram linfopenia B e T resistente em bacteremia gram-positivas. Tais resultados vêm ao encontro dos resultados de leucopenia e linfopenia nos animais do grupo sepse na presente pesquisa, os quais demonstram potencial de aplicabilidade de novos parâmetros leucocitários como preditores da sepse.

Também avaliamos que o desenvolvimento de trombocitopenia durante a sepse é complexo e envolve muitos fatores, como a disfunção endotelial/coagulopatia associada com hemodiluição, críticos na ativação e no consumo de plaquetas (BEDET et al., 2018). Os níveis baixos de RPL foram encontrados em pacientes com bacteremia e resultado de hemoculturas gram-positivas, associadas às disfunções imuno e hematológicas com coagulopatias no agravo do quadro clínico da sepse (DJORDJEVIC et al., 2018). Em nosso estudo, os animais sépticos apresentaram RPL inferiores aos dos animais do grupo controle, demonstrando a disfunção endotelial e consumo de células imunes pela progressão do quadro inflamatório da sepse.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados descritos, em relação aos parâmetros hematológicos apresentados pode-se afirmar que a sepse em camundongos leva à leucopenia, decorrente da linfopenia e também à trombocitopenia, as quais são demonstradas também pela Relação Plaqueta/Linfócito, caracterizando-a como um bom biomarcador para sepse neste modelo animal.

AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPERGS, CAPES, UNIUI, PPGAIS, GPeF.

Palavras-chave: Leucócitos. Plaquetas. Sepse. Biomarcadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, Brenna et al. Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 45, p. 1-5, 2017.
- BEDET, Alexandre et al. Mechanisms of thrombocytopenia during septic shock: a multiplex cluster analysis of endogenous sepsis mediators. Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches, v. 49, n. 6, p. 641-648, 2018.
- DE JAGER, Cornelis PC et al. Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit. *Critical care*, v. 14, n. 5, p. 1-8, 2010.
- DJORDJEVIC, Dragan et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, monocyte-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and mean platelet volume-to-platelet count ratio as biomarkers in critically ill and injured patients: which ratio to choose to predict outcome and nature of bacteremia?. *Mediators of inflammation*, v. 2018, 2018.
- GUCYETMEZ, Bulent; ATALAN, Hakan K. C-reactive protein and hemogram parameters for the non-sepsis systemic inflammatory response syndrome and sepsis: What do they mean?. *PLoS One*, v. 11, n. 2, p. e0148699, 2016.
- SEYMOUR, C. W. et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, v. 315, n. 8, p. 762-774, 2016.