

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE ENFERMAGEM

MARIA MILENA FIGUEIREDO MULLER

**AVALIAÇÃO DO USO DO MCC950 NA INIBIÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3
NO PROCESSO DE MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO CHOQUE SÉPTICO**

**CRICIÚMA
2024**

MARIA MILENA FIGUEIREDO MULLER

**AVALIAÇÃO DO USO DO MCC950 NA INIBIÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3
NO PROCESSO DE MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO CHOQUE SÉPTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Bacharel no curso de Enfermagem da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Dominguni

**CRICIÚMA
2024**

MARIA MILENA FIGUEIREDO MULLER

**AVALIAÇÃO DO USO DO MCC950 NA INIBIÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3
NO PROCESSO DE MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO CHOQUE SÉPTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de Enfermagem da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Fisiopatologia

Criciúma, 19 de novembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diogo Domingui – (UNESC) – Orientador

Prof. Dra. Karina Cardoso Gulbis - (UNESC)

Prof. Dra. Luciane Bisognin Ceretta - (UNESC)

Dedico esse trabalho à minha mãe Marisangela Figueiredo, que com tanto trabalho árduo me proporcionou todas as oportunidades que nunca pode ter. Todas as minhas conquistas também são suas, são nossas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente todos os professores e profissionais que transpassaram pela minha jornada acadêmica e foram fonte de inspiração e exemplo. À minha mãe, por todo empenho em me guiar e me sustentar durante os períodos mais difíceis e cansativos. À todas as amigas que fiz durante a vida e principalmente durante a graduação, que dividiram comigo o peso dos dias mais difíceis e a incerteza dos passos seguintes. Ao meu namorado, por ser a calma necessária em todas as vezes que eu fui agitação. Em especial, um agradecimento ao meu orientador e amigo, Diogo Domingui, que durante todos os anos de pesquisa e nessa última etapa de TCC, me ensinou além da técnica e da ciência, sendo um grande exemplo de dedicação e bondade.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”.
Friedrich Nietzsche

RESUMO

A sepse é uma resposta inflamatória severa e potencialmente fatal do nosso organismo que tem ligação com a ativação do inflamassoma NLRP3, que por sua vez tem participação no processo inflamatório no quadro de sepse. Pesquisas recentes apontam que o medicamento MCC950 tem o potencial de inibir o inflamassoma NLRP3, diminuindo assim a clivagem de citocinas como a interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18), tendo um papel importante na diminuição das espécies reativas de oxigênio (ERO), modulando a atividade inflamatória inicial na sepse e diminuindo um possível dano cognitivo que se faz presente no quadro séptico. O estudo de novas formas de manejar e tratar pacientes sépticos se faz importante frente à perspectiva de diminuir a grande mortalidade e sequelas deixadas pela doença, além reduzir os custos gerados para a saúde pública. Diante disso, esse projeto visou avaliar o uso do medicamento MCC950 e seus efeitos na inibição do inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento do choque séptico e o seu envolvimento com as alterações imunológicas em ratos Wistar adultos submetidos a modelo de choque séptico. Para isso foram utilizados ratos wistar, machos, pesando entre 250-300g. Os animais foram divididos em três grupos experimentais, sham+salina, sepse+salina e sepse+inibidor de NLRP3. Quando os animais atingiram 60 dias de vida (fase adulta), foram submetidos ao choque séptico através do modelo de ligação e perfuração cecal (CLP), também foi puncionado a veia jugular para a infusão da salina e para a administração do inibidor. Quando avaliado o estado de choque, foi realizado a reposição de solução salina (0,9%, 3 mL / kg, 0,1 mL / min) em todos os grupos experimentais, sendo que o grupo CLP + inibidor NLRP3, recebeu uma única injeção intravenosa de MCC950 na dose de 3mg/Kg. Após 72 horas, os animais foram eutanasiados e mortos para a remoção das estruturas cerebrais, coração, rim, pulmão e fígado para avaliação dos níveis de citocinas, dano oxidativo, quantidade de ERO e a expressão de NLRP3. Como resultados, foi possível observar a estabilização hemodinâmica no grupo receptor do inibidor e também a diminuição dos níveis de lactato, intervindo na situação de choque séptico previamente estabelecido. O inibidor foi capaz ainda de diminuir os níveis de expressão do inflamassoma NLRP3 nos tecidos do hipocampo, córtex pré-frontal, coração, rim, pulmão e fígado. Quanto à modulação da inflamação, o MCC950 foi capaz de diminuir os níveis de IL-1B nos tecidos de córtex frontal, hipocampo, coração, pulmão e rim, porém não no fígado; também diminuiu os níveis

de IL-18 no coração, pulmão e fígado, mas não nos tecidos de córtex frontal, hipocampo e rim. Também foi responsável pela diminuição da IL-6 no hipocampo, coração, pulmão e rim, mas sem resultados significativos no córtex frontal e no fígado. Já na IL-10, observou-se um aumento dessa citocina somente no pulmão do grupo receptor do inibidor. Já quanto a produção de espécies reativas do oxigênio, ocorreu uma diminuição significativa nos tecidos de córtex frontal, hipocampo, coração, pulmão e rim, diferença essa que não foi observada no tecido hepático. Em conclusão, a inibição do NLRP3 pelo medicamento MCC950 atenuou o dano inflamatório ocasionado pelo choque séptico em múltiplos órgãos, melhorando assim a resposta fisiológica do organismo, podendo assim ser usado como futuro alvo terapêutico.

Palavras-chave: sepse, choque séptico, inflamassoma, neuroinflamação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: escala de SOFA para diagnóstico da sepse.....	17
Figura 2: escala qSOFA para diagnóstico da sepse.....	17
Figura 3: mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3 (vias canônicas, não canônicas e alternativas).	26
Figura 4: desenho experimental.....	34
Figura 5: valores da Pressão Arterial Média (PAM).....	38
Figura 6: valores de lactato.....	39
Figura 7: expressão de NLRP3.....	40
Figura 8: níveis de IL-1B.....	41
Figura 9: níveis de IL-18.	42
Figura 10: níveis de IL-6.	43
Figura 11: níveis de IL-10.	43
Figura 12: níveis de DCF-DA.....	44
Figura 13: resumo dos resultados encontrados na pesquisa.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: agência nacional de vigilância sanitária;
APAs: células apresentadoras de antígenos;
ATP: adenosina trifosfato;
Ca²⁺: íon de cálcio;
C3a: proteína do sistema imune;
C5a: proteína do sistema imune;
ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1;
CDs: células dendríticas;
Cl⁻: íon de cloro;
CLP: ligação e perfuração cecal;
DAMPs: padrões moleculares associados a perigos;
eNOS: enzima óxido nítrico sintase endotelial;
ERRO: espécies reativas de oxigênio;
FAPESC: fundação de amparo à pesquisa e inovação do estado de Santa Catarina;
FC: frequência cardíaca;
GMPc: monofosfato cíclico de guanosina;
HCL: ácido clorídrico;
HK1: calicreína tecidual humana;
H₂O₂: peróxido de hidrogênio;
IL: interleucina;
K⁺: íon e potássio;
Kg: quilograma;
LPs: lipopolissacarídeos
MAC: complexo de ataque à membrana;
MAPKs: proteínas quinases ativadas por mitógenos;
Mg: miligrama;
Mi: mililitro;
NaCl: cloreto de sódio;
NEK7: quinase multifuncional;
NF-κB: factor nuclear kappa B;
Nm: nanômetro;
Nmol: nanomol;

NO: óxido nítrico;

O₂^{•-}: ânion superóxido;

PAI-1: inibidor 1 do ativador do plasminogênio;

PAM: pressão arterial média;

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos;

PBS: tampão fosfato-salino;

PI3K: fosfoinositídeo 3-quinase;

PKM2: piruvato quinase M2;

RNS: espécies reativas de nitrogênio;

qSOFA: rápida avaliação sequencial de falência de órgãos;

SDMO: síndrome de disfunção de múltiplos órgãos;

SDS: sulfato de sódio;

SIRS: síndrome de resposta inflamatória;

SOD: enzimas superóxido dismutase;

SOFA: avaliação sequencial de falência de órgãos;

SPSS: statistical packpage for the social Science;

TBA: ácido tiobarbitúrico;

TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico;

TCA: ácido tricarbóxico;

TLRs: receptores do tipo Toll;

TLR2: receptor do tipo toll de bactérias gram-positivas;

TLR4: receptor do tipo toll de bactérias gram-negativas;

TNF- α : fator de necrose tumoral α ;

μ L: microlitro.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2.SEPSE	15
2.1.DEFINIÇÃO E DIAGNÓSTICO	15
2.2.EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE.....	18
2.3.CHOQUE SÉPTICO	18
2.4.TRATAMENTO DO CHOQUE SÉPTICO.....	20
2.5.FISIOPATOLOGIA DO CHOQUE SÉPTICO.....	21
3.INFLAMASSOMA NLRP3	25
3.1.PAPEL DO INFLAMASSOMA NLRP3 NO CHOQUE SÉPTICO	27
3.2.USO DE INIBIDORES DO INFLAMASSOMA NLRP3 EM SITUAÇÕES DE CHOQUE SÉPTICO.....	28
4.OBJETIVOS	30
4.1.OBJETIVO GERAL.....	30
4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5.METODOLOGIA	31
5.1.TIPO DE ESTUDO.....	31
5.2.LOCAL DO ESTUDO.....	31
5.3.AMOSTRA EXPERIMENTAL.....	31
5.4.DESENHO DO ESTUDO	33
5.5.PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	34
5.5.1.Modelo Animal De Sepsis	34
5.5.2.Inibidor Do Inflamassoma NLRP3	35
5.5.3.Avaliação dos Níveis de IL-1B, IL-18, IL-6 e IL-10	35
5.5.4.Mensuração da Quantidade de Espécies Reativas de Oxigênio	36
5.5.5.Mensuração das Proteínas Totais	36
5.5.6.Western Blotting	36
5.5.7.Descarte E Destino Das Amostras Após Experimentação	37
5.6.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6.RESULTADOS	38
6.1.CONFIRMAÇÃO DO CHOQUE SÉPTICO.....	38
6.2.EXPRESSÃO DE NLRP3	39
6.3.CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	40
6.4.PRODUÇÃO DE ERO.....	44
7.DISSCUSSÃO	46
8.CONCLUSÃO	56

1. INTRODUÇÃO

O inflamassoma NRLP3 é responsável pela indução da resposta pró-inflamatória no organismo, que em seu funcionamento fisiológico tem como objetivo eliminar patógenos e auxiliar no funcionamento do organismo. Porém, sua ativação exacerbada (feita através de microorganismos patogênicos e moléculas endógenas perigosas) é responsável pela ocorrência e desenvolvimento de uma variedade de doenças relacionadas à inflamação, como aterosclerose, gota, doenças neurodegenerativas e obesidade (LI et al., 2022).

Os mecanismos biológicos que impulsionam a sepse em direção ao choque séptico e causam diversas alterações no organismo ainda não estão bem elucidados. A sepse não apenas possui uma alta taxa de mortalidade, mas deixa sequelas cognitivas e funcionais nos sobreviventes mesmo após a alta hospitalar; a redução da qualidade de vida dos sobreviventes também é perceptível. Segundo uma pesquisa feita por Coelho et al. (2019) com pacientes após internação por sepse, as sequelas percebidas foram alterações sensoriais, sensibilidade estomacal e transtornos psicológicos e psiquiátricos. Além disso, a doença também deixa o sistema imunológico enfraquecido e mais suscetível a doenças cardíacas, pulmonares e renais.

Estudos vêm apontando que a cascata inflamatória presente na sepse, causada pelo aumento das citocinas como IL-1 β e IL-18 (que por sua vez são mediadas pelo inflamassoma NRLP3) causam disfunção cerebral aguda e de longo prazo. Sendo assim, a inibição desse inflamassoma surge como uma nova estratégia que pode auxiliar no tratamento de diversas doenças, diminuindo a morbimortalidade causada pelas mesmas e melhorando a qualidade de vida dos pacientes que foram acometidos.

O investimento em pesquisas de novos tratamentos que possam agir mais rapidamente no tratamento da sepse é crucial para reduzir o sofrimento e garantir que a superação da sepse signifique o retorno a uma vida plena e saudável, auxiliando também a diminuir o tempo de internação, as intervenções realizadas e consequentemente amortizando os impactos financeiros nos serviços de saúde e prevenindo a superlotação dos mesmos.

Diante disso, levanta-se o questionamento de qual o impacto da inibição do inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento do choque séptico e nas alterações imunoquímicas causadas pelo mesmo, de forma a estabelecer uma relação entre sua inibição e um melhor prognóstico perante o choque séptico.

2. SEPSE

2.1. DEFINIÇÃO E DIAGNÓSTICO

Em uma retomada histórica, o conceito de sepse tem suas origens na língua grega, com significado de putrefação. Foi tida como uma dispersão da infecção pela corrente sanguínea, sendo chamada inclusive de envenenamento do sangue na língua alemã (SALOMÃO et al., 2019). Já em 2016, a Sociedade de Medicina Intensiva e a Sociedade Europeia de Medicina Intensiva publicaram uma diretriz que revisava o conceito de sepse, estabelecendo-a como uma disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (GAUER; FORBES; BOYER, 2020).

Ainda sobre o conceito de sepse, Singer et al. (2016) expõe que “a sepse não é uma doença específica, mas sim uma síndrome que engloba uma patobiologia ainda incerta”. Portanto, para realizar o seu diagnóstico é necessário a análise de diversos sinais clínicos e sintomas apresentados pelo paciente com suspeita de infecção, visto que não há um teste específico para a detecção da sepse, mas sim a junção de diversos critérios clínicos.

Quanto à fisiopatologia da doença, é inerente da sepse a resposta exacerbada do organismo frente a uma irritação causada por um patógeno. Essa resposta exagerada do organismo é caracterizada por uma produção excessiva e descontrolada de fatores inflamatórios, que causam modificações nos mais diversos sistemas do organismo (ARAUJO et al., 2022). Dentre essas modificações, ocorre o aumento da permeabilidade do sistema cardiovascular que leva a redução do volume sanguíneo disponível para circulação, dificultando a perfusão capilar e diminuindo o débito cardíaco, que quando atinge o nível de perfusão tecidual insuficiente, caracteriza um quadro de choque séptico (ARAUJO et al., 2022).

A sepse causa uma ativação desordenada de interleucinas, o que acaba incapacitando a correta maturação de neutrófilos (a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos), o que torna o paciente ainda mais suscetível a outras infecções e prolonga as lesões teciduais (ARAUJO et al., 2022). Cabe ainda citar as manifestações clínicas mais comuns da patologia, que são perceptíveis principalmente nos sistemas cardiovascular, pulmonar e renal. Conforme citado por Araújo et al. (2022):

No primeiro sistema, geralmente se observa alteração do padrão hemodinâmico, o qual é percebido através de hipotensão arterial e taquicardia relevante. Em relação ao sistema respiratório, o quadro clínico pode cursar com taquipneia e/ou dispneia e, principalmente em sepses de foco pulmonar, pode evoluir para a síndrome do desconforto respiratório agudo, a qual inicia-se com edema e hemorragia alveolar e posteriormente consolida-se na forma de microatelectasias e dano alveolar difuso. No que toca ao sistema renal, o rim não suporta a intensa vasodilatação, o extravasamento endotelial e a perfusão deficiente, condição responsável por ocasionar uma distensão peritubular edematosa e/ou lesão renal aguda.

Outras manifestações que não estão correlacionadas a sistemas específicos são a dor intensa e difusa, febre ou hipotermia, alteração do estado mental (confusão, rebaixamento sensorial), aumento de leucócitos e glóbulos brancos imaturos, aumento do lactato, diminuição do pH sanguíneo, coagulação intravascular disseminada (que pode causar obstrução) e hipotensão (ARAUJO et al., 2022).

O diagnóstico é feito através da utilização do escore de Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos (SOFA), onde é necessário a pontuação de dois ou mais critérios para que se estabeleça a disfunção, entre os itens analisados realiza-se a avaliação da função renal, hepática, respiratória, cardiovascular e também realização da escala de Glasgow para avaliar sistema nervoso central e análise da coagulação (SANTOS; NUNES, 2019). Para o diagnóstico do choque séptico, foi estabelecido a necessidade de utilização de um vasopressor para a manutenção da pressão arterial média (PAM) acima de 65 mmHg após infusão de fluídos, associada a um nível sérico de lactato acima de 2 mmol/L, caracterizando uma hiperlactemia (SANTOS; NUNES, 2019).

Figura 1: escala de SOFA para diagnóstico da sepse.

Sistema (Parâmetro)	Pontuação				
	0	1	2	3	4
Respiratório PaO ₂ /FIO ₂	>400 mmHg	<400 mmHg	<300mmHg	< 200 mmHg com suporte ventilatório	<100 mmHg com suporte ventilatório
Coagulação (Plaquetas)	≥ 150 x 10 ³	<150x10 ³	<100x10 ³	<50x10 ³	<20x10 ³
Hepático (Bilirrubina)	<1,2 mg/dL	1,2-1,9 mg/dL	2-5,9 mg/dL	6-11.9 mg/dL	>12 mg/dL
Cardiovascular (PAM)	≥ 70 mmHg	<70 mmHg	dopamina < 5 µg/kg/min ou qualquer dose de dobutamina	dopamina 5, 1-15 µg/kg/min ou epinefrina ≤ 0,1 µg/kg/min	dopamina >15 µg/kg/min ou epinefrina > 0,1µg/kg/min ou norepinefrina >0,1µg/kg/min
SNC (Glasgow)	15	14-13	12-10	9-6	< 6
Renal (Creatinina/fluxo urinário)	Cr sérica <1,2 mg/dL	Cr sérica 1,2-1,9 mg/dL	Cr sérica 2-3,4 mg/dL	Cr sérica 3,5-4,9 mg/d Fluxo urinário < 500 mL/24h	Cr sérica >5 mg/dL Fluxo urinário < 200 mL/24h

PAM: Pressão arterial. SNC: sistema nervoso central. Cr: creatinina. Fonte: Coelho BFL, Murad LS, Bragança RD. Manual de Urgências e Emergências. Rede de Ensino Terzi, 2020

Fonte: Coelho BDL, Murad LS, Bragança RD. Manual de Urgências e Emergências, 2020.

Um novo escore também foi adicionado para utilização, a fim de estabelecer um sinal de alerta sobre o estado de saúde do paciente, mas não para de fato estabelecer o diagnóstico de sepse: o “quisck sofá” (qSOFA), que apresenta parâmetros como frequência respiratória, mudanças no nível de consciência e pressão arterial sistólica, também com resultado positivo quando o paciente possui dois critérios estabelecidos na escala (SANTOS; NUNES, 2019).

Figura 2: escala qSOFA para diagnóstico da sepse.

Parâmetro	Valor
Pressão arterial sistólica	< 100mmHg
Frequência respiratória	> 22 irpm
Nível de consciência	Glasgow < 15

Fonte: Coelho BDL, Murad LS, Bragança RD. Manual de Urgências e Emergências, 2020.

2.2. EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE

Segundo um levantamento feito por Lins et al. (2022), entre os anos de 2017 a 2021 foram registradas 615.805 internações associadas ao CID de septicemia no Brasil. O ano com maior registro de casos foi 2019 com total de 106.617 internações, e o ano com menor número de registros foi 2021 com 40.906 notificações. Em relação aos óbitos hospitalares causados pela sepse, foram registrados um total de 279.765 casos, sendo que entre 2019 a 2020 as taxas aumentaram.

Em relação ao impacto financeiro causado, Da Silva et al. (2023) realizou um estudo descritivo com levantamento de dados por meio do Sistema de Informações Hospitalares (SIH/DATASUS) entre os anos de 2011 a 2020. Segundo o estudo, durante esse período foi gasto o montante de R\$3.917.479.007,05 com internações de pacientes afetados pela sepse, sendo que o ano de 2019 corresponde ao ano com maiores gastos (cerca de 26,8%) e 2011 ao ano com menores gastos (cerca de 23%).

Ainda de acordo com o levantamento feito por Da Silva et al. (2023), a tendência de crescimento de gastos ao longo dos anos não ocorreu em 2020, possivelmente estando relacionado a pandemia de COVID-19. Esses gastos acabam sobrecarregando a saúde pública e prejudicando o orçamento dos serviços de saúde, visto que os mesmos precisam investir em tratamentos curativos e o investimento em saúde preventiva pode acabar ficando em segundo plano (DA SILVA et al., 2023; NASCIMENTO et al., 2023; CARVALHO et al., 2024)

Englobando a sepse, o choque séptico apresenta uma das maiores taxas de mortalidade entre condições críticas, superando até mesmo infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral (ABREU et al., 2023). Estudos recentes indicam que a mortalidade associada ao choque séptico pode variar amplamente, com algumas instituições relatando taxas superiores a 60% e com uma permanência média em UTI de aproximadamente 14 dias a 20 dias (MACIAS et al., 2024; SANTOS et al., 2024).

2.3. CHOQUE SÉPTICO

O choque séptico é entendido como o último estágio de evolução da sepse, sendo que ele é uma síndrome severa marcada pela má perfusão capilar, que por sua vez é causada por uma disfunção funcional das células (SINGER et al., 2016). Junto a isso, acrescenta-se as disfunções orgânicas e sistêmicas que não puderam ser

reparadas anteriormente, levando a um quadro nomeado de Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO) e aumentando severamente a mortalidade da doença (PASCHOAL, 2021). Ele é identificado quando ocorre uma hipotensão que leva a necessidade do uso de vasopressores para manutenção da pressão arterial média (PAM) acima ou igual a 65 mmHg; também é necessário que os níveis de ácido láctico estejam acima de 2 mmol/L, persistindo mesmo após protocolo de reposição volêmica (REIS et al., 2021),

As manifestações clínicas contam com a inadequada perfusão de órgãos e tecidos periféricos e a necessidade prolongada de administração de drogas vasoativas que mantêm a PAM em níveis adequados. Conforme abordado por Araújo et al. (2022):

O choque séptico caracteriza-se clinicamente pela vasodilatação arteriolar grave, a qual se desenvolve paralelamente à um quadro de hipocalcemia, hiperlactatemia, acidose metabólica, hipóxia, redução do retorno venoso e do débito cardíaco, diminuição acentuada da pressão venosa central, taquicardia e queda súbita da pressão arterial.

Nos serviços de terapia intensiva, uma grande preocupação dos profissionais é manter a boa perfusão e funcionamento dos órgãos do paciente a fim de se prevenir lesões nos mesmos, também é uma prioridade a estabilidade hemodinâmica e oferta adequada de oxigênio aos tecidos. Contudo, como abordado por Reis et al. (2021), o ambiente de terapia intensiva também é um lugar estressor que pode causar gerar respostas fisiológicas autonômicas, o que pode dificultar no diagnóstico e manejo do quadro séptico, incluindo a geração do delirium.

O choque séptico pode ainda ser dividido entre choque frio (devido a vasoconstrição, com baixa frequência cardíaca e pressão arterial) e choque quente (caracterizado por vasodilatação, com baixa pressão arterial e alta frequência cardíaca). Conforme abordado por Garcia, Tonial e Piva (2019), a maior parte dos pacientes que apresentam choque séptico frio são advindos de infecções comunitárias (extra hospitalares) e pacientes que apresentam choque séptico quente são decorrentes de infecções intra hospitalares, como causada pelo uso de cateteres e outros.

Há ainda o choque séptico refratário, que é aquele que persiste mesmo após tratamento com drogas vasoativas. Nesses casos, é possível que haja outra causa subjacente que cause a não responsabilidade ao tratamento, como hipotireoidismo,

pneumotórax, perda contínua de sangue, presença de tecido necrótico, coagulopatia (GARCIA; TONIAL; PIVA, 2019).

Conforme um estudo conduzido por Biasio (2019) com o propósito de traçar o perfil de pacientes com sepse e choque séptico em uma Unidade de Terapia Intensiva, cerca de 54,1% dos pacientes eram do sexo feminino; pessoas com mais de 60 anos somaram 60,4% das admissões. A pré-existência de comorbidades também foi um fator presente no maior número de internações, somando cerca de 96,7% dos casos de internações, como a maior parte dos pacientes analisados eram idosos, a diminuição da resposta imune pode explicar esses quantitativos.

O microrganismo mais predominante nas culturas foi bacilo gram positivo *Staphylococcus*, e após alguns bacilos gram negativos, como *Escherichia coli* e *Klebsiella*. E quanto ao desfecho do quadro clínico, 70% dos pacientes evoluíram para óbito, o que demonstra a alta mortalidade e letalidade da doença, reforçando ainda a importância de estudos experimentais acerca de novos tratamentos para a mesma (BIASIO, 2019).

2.4. TRATAMENTO DO CHOQUE SÉPTICO

O manejo do choque séptico segue a mesma linha de tratamento de outras doenças que ameaçam a vida dos acometidos, com garantia de um suporte adequado de oxigênio aos tecidos, reposição volêmica em grandes quantidades visando a estabilização hemodinâmica, bem como o uso de drogas vasoativas que aumentem a contratilidade do coração. Segundo Garcia, Tonial e Piva (2019):

O objetivo é manter a oxigenação, a ventilação, a circulação e a frequência cardíaca nos limites da normalidade e restaurar as condições clínicas do paciente, melhorar a perfusão (enchimento capilar menor do que 2 segundos), com pulsos cheios e extremidades quentes, débito urinário maior do que 1 mL/kg/h, estado mental adequado e pressão arterial normal para a idade.

O tratamento preconiza o início rápido e usa uma estratégia de cinco pilares que utiliza o mnemônico de 5 "Cs": coleta de lactato, culturas, correr o antibiótico, cristalóides e constritores. O lactato atua como um importante indicador de que os tecidos estão recebendo pouco oxigênio e tendo que recorrer a respiração anaeróbica, que produz muito lactato como subproduto. Quando se apresenta alto, é de suma

importância realizar nova medição a cada duas ou quatro horas, porque o mesmo é um indicativo de choques como cardiogênico e hemorrágico (SILVA; MELO, 2023).

A coleta de hemocultura deve ser feita para proporcionar um correto tratamento com antibióticos, possibilitando o direcionamento correto do tratamento para que o mesmo seja compatível com o patógeno presente no indivíduo. Sendo assim, outro pilar importante é a administração de antibióticos potentes, mas que sejam corretamente relacionados ao foco da infecção, por exemplo se é comunitária ou decorrente de hospitalização (SILVA; MELO, 2023).

Os cristaloides são infusões com eletrólitos para protocolo de ressuscitação volêmica. De acordo com Silva e Melo (2023), o protocolo deve ser feito usando principalmente solução balanceada (ringer lactato) e não salina, bem como o uso de albumina deve ser resguardado a pacientes que precisem de grandes volumes de infusão. Por último, o uso de constritores (drogas vasoativas) deve ser feito se o paciente apresentar PAM menos que 65 mmHg após a ressuscitação volêmica.

O tratamento antimicrobiano veio como uma revolução terapêutica para diversas doenças, porém o seu uso indiscriminado ao longo dos anos tornou os microrganismos capazes de adaptar ao meio, o que os torna resistentes a diversas terapias microbianas existentes, dificultando assim o tratamento da sepse (GAZEL, 2023). Sendo assim, se faz cada vez mais necessário o desenvolvimento de drogas que atuem nos complexos mecanismos envolvidos no processo de sepse e choque séptico.

2.5. FISIOPATOLOGIA DO CHOQUE SÉPTICO

A fisiopatologia do choque séptico envolve uma complexa rede de eventos bioquímicos e celulares que culminam na disfunção e falência de múltiplos órgãos. Esse processo patológico tem origem na ativação do sistema imune inato, desencadeada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (HUANG et al., 2020).

As células dendríticas (CDs) e os macrófagos, atuando como células apresentadoras de antígenos (APCs), desempenham um papel central nessa fisiopatologia (BARICHELLO et al., 2022). Essas células expressam uma variedade

de PRRs, incluindo os receptores do tipo Toll (TLRs), que reconhecem moléculas como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas (TLR4) e lipoproteínas e peptidoglicanos de bactérias gram-positivas (TLR2) (LIU et al., 2022; JACOBI et al., 2022).

A ativação desses PRRs nas CDs e macrófagos desencadeia uma cascata de sinalização intracelular complexa, envolvendo a ativação de quinases, como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) (BARICHELLO et al., 2022). Essas vias de sinalização convergem na translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo, onde ele induz a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (LIU et al., 2022).

As citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis fundamentais na fisiopatologia do choque séptico. A IL-1 β e o TNF- α , ao se ligarem a seus respectivos receptores, ativam a via do NF- κ B em outras células, amplificando a resposta inflamatória (ZHU et al., 2022). Esses mediadores também estimulam a produção de outras citocinas, como a interleucina-8 (IL-8) e quimiocinas, que são responsáveis pelo recrutamento e ativação de células efectoras, como os neutrófilos (ZHU et al., 2022).

Além disso, as citocinas pró-inflamatórias ativam as células endoteliais, desencadeando uma série de eventos bioquímicos que contribuem para a disfunção vascular. Essas células, ao serem estimuladas por IL-1 β e TNF- α , aumentam a expressão de moléculas de adesão, como as selectinas (P-selectina e E-selectina) e as integrinas (ICAM-1 e VCAM-1), facilitando a migração de leucócitos para os tecidos (JACOBI et al., 2022).

As citocinas pró-inflamatórias também induzem a ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), resultando em aumento da produção de óxido nítrico (NO). Esse vasodilatador potente contribui para a hipotensão característica do choque séptico, por meio da ativação da guanilato ciclase solúvel e do consequente aumento dos níveis intracelulares de GMPc (ZHU et al., 2022). Adicionalmente, a ativação das células endoteliais leva à expressão de fator tecidual, ativando a cascata de coagulação. Isso resulta na formação de microtrombos, que agravam a disfunção vascular e a lesão de órgãos (BARICHELLO et al., 2022).

Paralelamente a esses eventos, ocorre a ativação do sistema complemento, uma via enzimática que desempenha um papel importante na fisiopatologia do choque séptico (HUANG et al., 2020; ZHU et al., 2022). A ativação do complemento, via clássica (anticorpos), via alternativa (PAMPs) ou via das lectinas, gera peptídeos vasoativos, como o C3a e C5a, que contribuem para a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de leucócitos (MUNROE et al., 2023). Além disso, a ativação do sistema complemento leva à formação do complexo de ataque à membrana (MAC), que pode causar lise celular direta, agravando a disfunção vascular e a lesão de órgãos. Essa ativação do complemento está intimamente relacionada à ativação da cascata de coagulação, observada no choque séptico (BARICHELLO et al., 2022; ZABOCK et al., 2023).

Outro aspecto fundamental na fisiopatologia do choque séptico é o estresse oxidativo. A ativação do sistema imune inato leva a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (RNS), como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO), e os mecanismos de defesa antioxidante, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (JABOCI et al., 2022). Esse estresse oxidativo causa danos diretos a estruturas celulares, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, contribuindo para a disfunção orgânica (LIU et al., 2022). As ROS e RNS podem inativar enzimas-chave, como as enzimas da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, prejudicando a produção de ATP (HUANG et al., 2020; ZARBOCK et al., 2023). Além disso, o estresse oxidativo ativa vias de sinalização intracelulares, como o fator de transcrição Nrf2, que regula a expressão de genes relacionados à resposta antioxidante, em uma tentativa de contra regulação desse desequilíbrio (DOMINGUINI et al., 2022).

A resposta inflamatória exacerbada, juntamente com o estresse oxidativo, contribui para o desenvolvimento de disfunção mitocondrial. As mitocôndrias, que são essenciais para a produção de energia celular, tornam-se disfuncionais devido ao ataque das ROS e RNS, resultando em uma produção inadequada de ATP (DOMINGUINI et al., 2022). Essa disfunção energética é um dos fatores chave para a falência de múltiplos órgãos observada no choque séptico (LIU et al., 2022; BARICHELLO et al., 2022).

A permeabilidade vascular aumentada, induzida pelas citocinas pró-inflamatórias e pelo estresse oxidativo, resulta na perda de fluidos e proteínas do compartimento intravascular para o interstício, levando à hipovolemia relativa (MUNROE et al., 2023; ZHU et al., 2022). Essa perda de fluidos é agravada pela vasodilatação generalizada mediada pelo NO, contribuindo para a hipotensão e choque circulatório característicos do choque séptico (MUNROE et al., 2023).

3. INFLAMASSOMA NLRP3

Inflamassomas são complexos multiproteicos que trabalham na regulação da imunidade inata por via de sinalizações. São compostos pela proteína NLR, proteína adaptadora ASC e a enzima pró-caspase-1, que trabalham em conjunto como um mecanismo de defesa do organismo. Atuam como sentinelas vigilantes no interior das células, prontos para defender o corpo contra invasores e células danificadas. (FERREIRA et al., 2020).

Um dos inflamassomas mais estudados tem sido o NLRP3, que tem se mostrado como um grande ativador de caspases alternativas que levam a piroptose, que é a morte celular induzida por infecção (DOMINGUINI et al., 2022). Apesar do seu importante papel no sistema imune, sua ativação exagerada pode levar ao aparecimento de doenças autoimunes, inflamação crônica, danos teciduais e morte celular (FERREIRA et al., 2020).

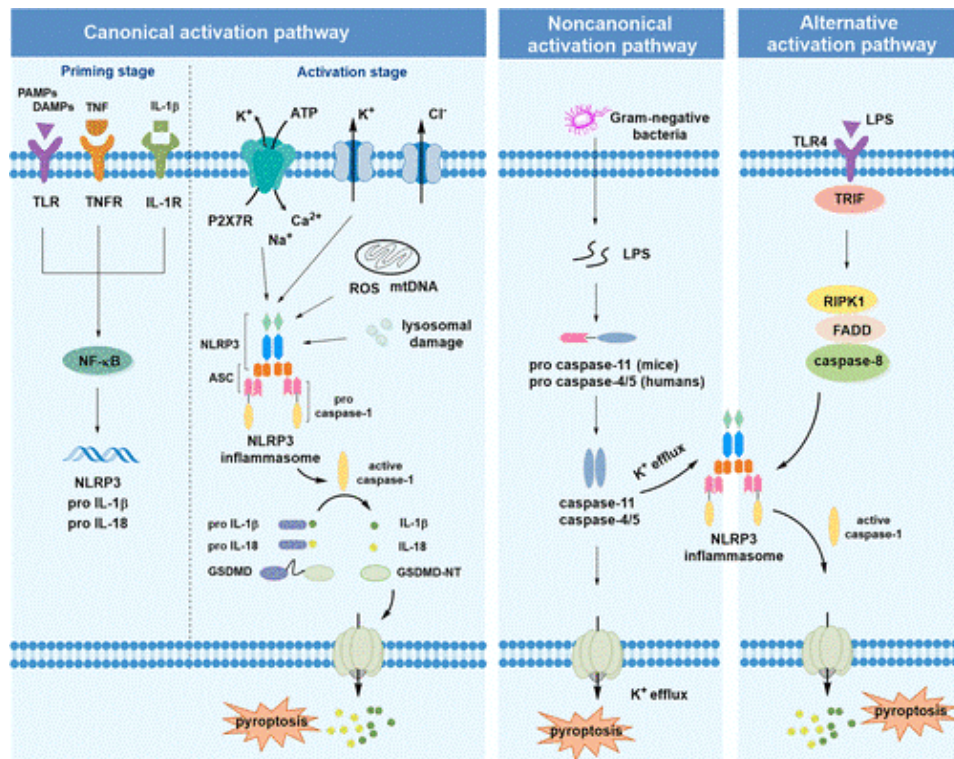
Este inflamassoma está ligado a diversas condições clínicas, como tumores, doenças neurodegenerativas e inflamações. Ele vem se tornado um alvo de estudos principalmente pela possibilidade de ser ativado de diferentes maneiras, e a busca é por elucidar todos os seus meios de estímulos, que até então não foram totalmente esclarecidos (KELLEY et al., 2019). A maior parte dos inflamassomas são ativados por meio de mecanismos específicos, mas o NLRP3 pode ser ativado devido a vários estímulos não correlacionados, como K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , destruição lisossomal, disfunção mitocondrial e alterações metabólicas (ZHANG et al., 2023).

A ativação canônica desse inflamassoma na sepse ocorre em duas etapas: priming e ativação. São liberados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), estes são percebidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Isso ativa as vias de sinalização do NF- κ B (VIGNERON et al., 2023).

Após isso vem o estágio de ativação, onde fatores como efluxo de K^+ , sinalização de Ca^{2+} , espécies reativas de oxigênio (ERO), disfunção mitocondrial e dano lisossomal podem ativar o inflamassoma NLRP3. Após ativado, o NLRP3 recruta a proteína adaptadora, que por sua vez recruta a pró-caspase-1. Posteriormente, a pró-caspase-1 ativa a clivagem de pró-IL-1 β e pró-IL-18 em IL-1 β e IL-18 e também a gasdermina citoplasmática D (que permite a criação de poros na membrana),

desencadeando a morte celular por meio da piroptose; dessa forma, há liberação de citocinas e início da cascata inflamatória (ZHANG, 2023).

Figura 3: mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3 (vias canônicas, não canônicas e alternativas).



Fonte: Med. Química. 2023.

A ativação não canônica é feita diretamente pelas caspases-4 e -5 que reconhecem os lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas e já inicia a clivagem de gasdermina D; a criação de poros na membrana leva à piroptose e liberação de IL-1 β e IL-18 (VIGNERON et al., 2023). Já a via alternativa de ativação deste inflamassoma é específica de monócitos humanos e suínos, e ativa por meio de TLR4 – TRIF – RIPK1 – FADD – CASP8, não dependendo do fluxo de potássio ou da piroptose; sendo que esse mecanismo ainda é um intenso alvo de pesquisas, visto que não é totalmente compreendido (ZHANG, 2023).

3.1. PAPEL DO INFLAMASSOMA NLRP3 NO CHOQUE SÉPTICO

O inflamassoma NLRP3 é ativado durante a fase aguda da sepse por meio de monócitos, neutrófilos e em alguns subconjuntos de células dendríticas. Apesar do seu papel protetor ao organismo, quando presente em altos níveis no mesmo, o inflamassoma possui um papel nocivo. Conforme citado por Vigneron et al. (2023) apud Lu et al. (2017), conforme observado a redução da expressão de NLRP3, ocorreu também a diminuição de níveis sanguíneos de IL-1 β e TNF, além de demonstrar uma parada de progressão da sepse para choque séptico.

Outro dano causado por essa cascata inflamatória é a quebra das barreiras intersticiais e endoteliais no pulmão, o que diminui a complacência pulmonar. Também ocorre o aumento da permeabilidade da camada interna da mucosa do trato gastrointestinal, o que leva ao extravasamento de bactérias do mesmo, causando disfunção gastrointestinal. Além da lesão renal causada pela diminuição da perfusão, a necrose tubular aguda e o dano microvascular (SHI; TAN; TAN, 2021).

Outro dano perceptível é a perturbação da barreira hematoencefálica, permitindo com que toxinas e células inflamatórias permeiem no cérebro e causem estresse oxidativo e neurodegeneração. Portanto, ao inibir essa resposta inflamatória é possível proteger o organismo dos diversos danos celulares causados pela mesma (SHI; TAN; TAN, 2021).

Durante o choque séptico, observa-se uma reprogramação metabólica dramática nos macrófagos, incluindo aumento da glicólise e redução do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (LUO et al., 2022). Essa desregulação metabólica está intimamente relacionada à ativação do inflamassoma NLRP3. Enzimas-chave da glicólise, como HK1 e PKM2, promovem a ativação do inflamassoma NLRP3. Além disso, metabólitos do ciclo de TCA, como citrato e succinato, também modulam a atividade do inflamassoma NLRP3 (LUO et al., 2022).

Por sua vez, a IL-1 β , ativada pelo inflamassoma NLRP3, também desempenha um papel importante na cardiomiopatia séptica. Camundongos com deleção de NLRP3 apresentam menores níveis séricos de IL-1 β e são protegidos contra a disfunção cardíaca sistólica e diastólica induzida pela sepse (DOMINGUINI et al., 2022). Além disso, a IL-1 β prejudica diretamente a contração e relaxamento dos cardiomiócitos, contribuindo para a disfunção miocárdica (BUSCH et al., 2021).

3.2.USO DE INIBIDORES DO INFLAMASSOMA NLRP3 EM SITUAÇÕES DE CHOQUE SÉPTICO

Muitos estudos atuais estão demonstrando a importância da inibição do inflamassoma NLRP3, como uma pesquisa referenciada por Vigneron et al. (2023), “camundongos tratados com inibidores de NLRP3 após vários insultos sépticos exibiram menos lesões orgânicas, como lesão renal aguda, disfunção cardíaca, lesão pulmonar aguda, falha hepática e encefalopatia associada à sepse”.

Alguns tratamentos para condições clínicas relacionadas ao inflamassoma NLRP3 são direcionados à IL-1 β , mas existem considerações sobre o possível aumento de risco de infecção que os mesmos causam. Portanto, considera-se mais interessante utilizar os inibidores que visam especificamente o inflamassoma NLRP3. Conforme citado por Zhang (2023):

Nos últimos anos, os pesquisadores suprimiram o inflamassoma NLRP3 através de vários alvos, explorando suas complexas vias de sinalização, incluindo a etapa inicial da ativação do inflamassoma NLRP3, o conteúdo de K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ e EROS no microambiente, a montagem de NLRP3 o inflamassoma e clivagem de GSDMD.

Entre os inibidores que são alvos frequentes de estudos estão os inibidores de TLR4, uma importante proteína que, combinada com seu respectivo ligante, pode iniciar a cascata de sinalização intracelular que estimula as citocinas pró-inflamatórias, portanto é responsável também pela modulação da inflamação e a expressão de NLRP3. Como exemplos de medicamentos inibidores de TLR4, temos o TAK-242 ou resatorvid. Porém, MCC950 tem sido alvo de inúmeros estudos por conseguir inibir e diminuir a expressão do inflamassoma de diferentes maneiras (ZHANG, 2023).

Uma etapa muito importante no processo de ativação desse inflamassoma é o efluxo de potássio, que faz com que NEK7 e NLRP3 formem um complexo; além de também ser responsável pela oligomerização de ASC, que cria partículas de ASC. São nessas partículas que o NLRP3 se associa, juntamente com a pró-caspase-1, a fim de formar o inflamassoma. Alguns estudos relatam que o medicamento MCC950 pode ter potencial de inibir a interação entre NEK7 e NLRP3, apesar dessa informação não estar completamente confirmada ainda (LI et al., 2022).

Uma das funções do MCC950 é inibir a oligomerização do ASC; sendo que ele também é responsável por interagir diretamente com as conformações ativas e inativas do NLRP3, sendo que seu alvo é a partícula de sequenciamento Walker B. O

medicamento também é um antagonista de IL-1 β e antagonista de liberação de citocinas, diminuindo a inflamação presente na sepse e em outras doenças (LI et al., 2022).

Segundo Li et al. (2022), o medicamento também vem sendo apontado por pesquisas como responsável por reduzir a maturação e a liberação de IL-1 β ao inibir a ativação do inflamassoma NLRP3, sendo que sua eficácia no combate de outras patologias como doenças autoimunes, doenças cardiovasculares e doenças metabólicas também vêm sendo comprovada. Além disso, a inibição de NLRP3 por MCC950, bem como a deficiência de NLRP3 ou ASC diminuiu os níveis de TAT, PAI-1, PT, dímero D e TF no sangue, prejudicando a formação de trombos e deposição de fibrina, bem como diminuiu a expressão de TF no fígado e pulmão na coagulação induzida por endotoxina, mas não na deficiência de caspase-11, o que pode ser bom durante o choque séptico (SHI et al, 2022)

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliação dos efeitos da inibição do inflamassoma NLRP3 no processo de desenvolvimento do choque séptico e o seu envolvimento com as alterações imunológicas em ratos Wistar adultos submetidos a modelo de choque séptico.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A)** Avaliação da pressão arterial média e sua oscilação em 0, 3, 6, 12, 48 e 72h após a indução do choque séptico de ratos Wistar adultos submetidos ao choque séptico pelo modelo de CLP e tratados com inibidor de NLRP3 e reposição volêmica;
- B)** Análise dos níveis de lactato em 0, 3, 6, 12, 48 e 72h após a indução do choque séptico de ratos Wistar adultos submetidos ao choque séptico pelo modelo de CLP e tratados com inibidor de NLRP3 e reposição volêmica;
- C)** Avaliação dos níveis de IL-1 β , IL-18, IL-6 e IL-10 após 72 horas de choque séptico nos tecidos do hipocampo, córtex pré-frontal, coração, rim, pulmão e fígado de ratos Wistar adultos submetidos ao choque séptico pelo modelo de CLP e tratados com inibidor de NLRP3 e reposição volêmica;
- D)** Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas ao oxigênio após 72 horas de choque séptico nos tecidos do hipocampo, córtex pré-frontal, coração, rim, pulmão e fígado de ratos Wistar adultos submetidos ao choque séptico pelo modelo de CLP e tratados com inibidor de NLRP3 e reposição volêmica;
- E)** Avaliação da expressão de NLRP3 após 72 horas de choque séptico nos tecidos do hipocampo, córtex pré-frontal, coração, rim, pulmão e fígado de ratos Wistar adultos submetidos ao choque séptico pelo modelo de CLP e tratados com inibidor de NLRP3 e reposição volêmica.

5. METODOLOGIA

5.1. TIPO DE ESTUDO

A abordagem da pesquisa foi quantitativa, sendo esse um método que se caracteriza pelo emprego da quantificação tanto nas modalidades de coleta de informações, quanto no tratamento delas por meio de técnicas estatísticas, também representa a intenção de garantir a precisão dos resultados, evitando distorções de análise e interpretação (RICHARDSON et al., 1999).

A pesquisa realizada foi do tipo exploratória, que permite ao investigador aumentar sua experiência em torno de um determinado problema. Consiste em explorar tipicamente a primeira aproximação de um tema e visa criar maior familiaridade em relação a um fato ou fenômeno (LEOPARDI, 2002, p.119). A mesma se deu de forma experimental, que está relacionado diretamente a variáveis relacionadas com o objeto de estudo e tem como finalidade testar hipóteses, gerando um controle laboratorial sobre as variáveis.

5.2. LOCAL DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, Santa Catarina, Brasil. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso Animal (CEUA/UNESC), sobre o número 53/2021.

5.3. AMOSTRA EXPERIMENTAL

O modelo animal é imprescindível neste estudo visto a necessidade de compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos do choque séptico, tanto no sistema nervoso central como também nos órgãos vitais, o que não poderia ser reproduzido na sua complexidade de interação entre células e estruturas em culturas de células ou outros métodos alternativos. Nosso conhecimento sobre as alterações fisiopatológicas que ocorrem no sistema nervoso central e em certos órgãos vitais após o choque sepse ainda são poucas (MEMIS et al., 2007; YANG et al., 2015).

Os animais foram submetidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração cecal (CLP), pois esse modelo é tido como padrão ouro dos modelos atualmente validados para indução de sepse, por reproduzir tipicamente as mudanças fisiopatológicas observadas em pacientes sépticos (DEJAJER et al., 2011). A utilização deste modelo é indispensável para a elucidação da fisiopatologia da sepse, sendo requisito indispensável ao desenvolvimento da pesquisa, visto que o estudo propõe a avaliação da resposta sistêmica do indivíduo, a doença e ao tratamento proposto, o que não viabiliza a utilização de modelos *in vitro*. Optamos pelo uso de ratos baseado nas similaridades dos sistemas fisiológicos dessa espécie aos seres humanos, e, portanto, a substituição desses animais por outros não vertebrados não é capaz de responder às perguntas propostas nesse tipo de experimentação.

Dar-se-á preferência a ratos *Wistar* machos da espécie (*Rattus norvegicus*), por seu maior peso corporal tornando possível a coleta de uma quantidade maior de material biológico e pouca alteração no ciclo hormonal, quando comparados a fêmeas, visto que estudos anteriores com modelos de inflamação aguda mostram que fêmeas de *Wistar* possuem contagens de leucócitos totais, neutrófilos, e monócitos diminuídas, indicando uma possível ação supressora e imunomodulatória do estradiol (LAZZARETTI et al., 2008), característica essa que pode interferir diretamente nos resultados obtidos. Deu-se preferência a ratos de 2 a 3 meses de idade e provenientes de lotes que apresentem tamanho uniforme, produzidos em colônias fechadas, procedimento este feito pelo biotério da instituição, na tentativa de se obter melhores resultados para esta pesquisa mantendo o conforto dos mesmos.

Para o cálculo amostral foram analisados estudos prévios em modelos animais, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias. Calculou-se um tamanho de amostra de 7 animais por grupo para os testes bioquímicos. Um fator que deve ser levado em conta no cálculo amostral é que a indução do choque séptico pode causar a morte de 50% dos animais, então no grupo sepse, foi acrescentado essa porcentagem no n amostral dos grupos. Sendo assim, um n total de 30 ratos wistar, machos com 60 dias, pesando entre 250-300g.

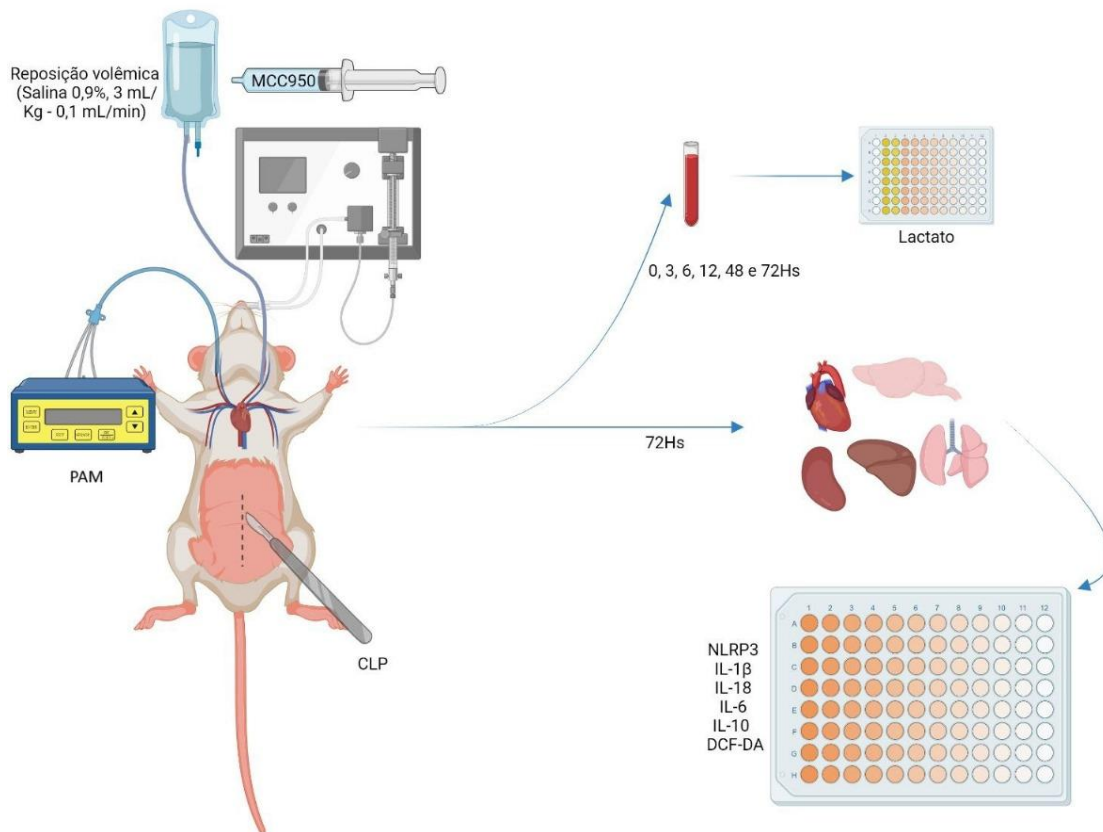
5.4. DESENHO DO ESTUDO

Os animais foram divididos em três grupos experimentais, sham+salina, sepse+salina e sepse+inibidor de NLRP3. Ao completarem 60 dias de vida, os animais foram anestesiados e submetidos ao choque séptico através do modelo de ligação e perfuração cecal (CLP), com extravasamento de grande quantidade de conteúdo intestinal na cavidade peritoneal. Logo após, os animais foram submetidos ao protocolo de ressuscitação volêmica, que consiste na manutenção da sedação do animal com 2% de isoflurano (Abbott, Maidenhead, Reino Unido) em ar ambiente e colocados em uma mesa aquecida para manter a temperatura retal a 37 °C, durante um período de 8 horas.

A fim de aferir a pressão arterial média, foi canulada a artéria carótida através de uma incisão local e colocado de um cateter de tubo de PVC de 0,96 mm de diâmetro externo (Biocorp Ltd, Huntingdale, Austrália). A linha arterial foi conectada a um transdutor de pressão (Powerlab; AD Instruments, Chalgrove, UK) para monitoramento contínuo da pressão arterial. Também foi realizado o puncionamento da veia jugular para a infusão de salina e para a administração do inibidor. O choque séptico foi estabelecido quando a PAM diminuiu para 25-30% do valor basal.

Quanto constatado o choque séptico, foi então realizado a reposição de solução salina (0,9%, 3 mL / kg, 0,1 mL / min) em todos os grupos experimentais, no entanto, no grupo CLP + inibidor NLRP3, além da salina, recebeu uma única injeção intravenosa de MCC950 na dose de 3mg/Kg. Após 72 horas do choque séptico, os animais foram eutanasiados e mortos para a remoção das estruturas cerebrais (hipocampo e córtex pré-frontal), coração, rim, pulmão e soro que foram armazenadas corretamente a -80°C para futuras análises imunoquímicas. Também foram analisados os níveis de citocinas e a expressão de NLRP3.

Figura 4: desenho experimental.



Fonte: da autora, desenvolvida pelo aplicativo BioRender.com, 2024.

5.5. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.5.1. Modelo Animal De Sepse

De acordo com Da Silva (2022), a escolha do animal a ser utilizado deve levar em consideração as características biológicas do mesmo, já que a sepse induzida no animal deve apresentar mudanças semelhantes às que ocorrem nos seres humanos; sendo que o modelo animal proposto é considerado modelo padrão-ouro para a indução de sepse e choque séptico em roedores. O modelo utilizado consiste em ligação e perfuração do cecal (CLP), onde os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal.

O ceco foi ligado abaixo da junção ileocecal com fio seda 3-0 e perfurado com uma agulha número 14, gentilmente comprimido até a extrusão de grande quantidade do conteúdo fecal a fim de gerar um quadro de choque séptico. Os planos cirúrgicos

foram fechados e os ratos observados por 8 horas. Todos os grupos receberam suporte básico com a administração ceftriaxona (30 mg/kg) a cada 6 horas por 72 horas. Como controle foi utilizado animais submetidos a laparotomia, sem ligação ou perfuração (Sham).

5.5.2. Inibidor Do Inflamassoma NLRP3

O MCC950 é um inibidor potente e altamente específico de pequenas moléculas da ativação canônica e não canônica do inflamassoma de NLRP3, foi avaliado em várias doenças inflamatórias com a participação do NLRP3, no entanto, não há estudos suficientes voltado o seu uso em choque séptico. Será administrado no grupo séptico tratado a dose de 3 mg/kg de MCC950 (PZ0280 – Sigma-Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) (dissolvido em 10 mL de PBS) e infusão intravenosa. Isso será administrado em conjunto com a reposição volêmica quando a PAM diminuir para 25-30% nos animais do grupo sepse+inibidor.

5.5.3. Avaliação dos Níveis de IL-1 β , IL-18, IL-6 e IL-10

Os níveis das citocinas IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-10 no hipocampo, córtex pré-frontal, coração, rim, pulmão e soro que foram determinados através do kit comercial pela técnica de ELISA (ELISA Sanduíche, através dos kits da Peprotech®). As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato salina (PBS). Foi adicionado primeiramente o diluente em cada poço e posteriormente a amostra, padrão ou controle. Em seguida, a placa foi coberta e incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem. IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-18 foram acrescentados em cada poço e novamente incubados por 2h à temperatura ambiente. Depois de lavadas, adicionou-se solução de substrato em cada poço e incubada por mais 30 min, a temperatura ambiente. Depois da incubação, foi adicionada solução stop para parar a reação. A densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 450 nm.

5.5.4. Mensuração da Quantidade de Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de ERO intracelular foi detectada usando o composto de permeação de células não fluorescentes, diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). O DCFH-DA é hidrolisado pelas esterases intracelulares em diclorofluorescina (DCFH). Essa molécula não fluorescente é então oxidada a diclorofluorescina fluorescente (DCF) pela ação de oxidantes celulares. As amostras foram homogeneizadas e tratadas com DCFH-DA (10 μ M) por 30 min a 37 °C. Após a exposição ao DCFH-DA, foram adicionadas em PBS com Triton X-100 0,2%. A fluorescência foi medida em um leitor de placas (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, EUA) com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm e os valores expressos como unidades de fluorescência/ μ g de proteína.

5.5.5. Mensuração das Proteínas Totais

As mensurações das proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry (1951) e a albumina sérica bovina utilizada como padrão. Para a realização da técnica, utilizou-se 10 μ L do tecido homogeneizado, o qual foi adicionado o reativo C (composto de uma mistura de hidróxido de sódio 0,1 molar, carbonato de sódio 2%, mais sulfato cúprico e tartarato de sódio/potássio). Logo após foram adicionados aos poços o Folin e a leitura deu-se em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 700nm.

5.5.6. Western Blotting

Para realizar a imunotransferência de NLRP3 nas estruturas, as amostras foram homogeneizadas em tampão Laemmli (TrisHCl 62,5 mM, pH 6,8, 1% (p / v) de dodecilsulfato de sódio (SDS), 10% (v / v) de glicerol) e quantidades iguais de proteína (30 μ g / poço) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferidas eletricamente para as membranas de nitrocelulose. A eficiência da transferência eletrônica foi verificada por coloração com Ponceau, e a membrana será então bloqueada em solução salina tampão Tris-Tween (TTBS: Tris HCl 100 mM, pH 7,5, contendo NaCl a 0,9% e Tween 20 a 0,1%) com albumina a 5%. As membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C com

coelho monoclonal NLRP3 (1: 1000). A IgG anti-coelho secundária foi incubada com a membrana por 2 horas (1: 10000). A imunorreatividade foi detectada por quimioluminescência utilizando ECL. A análise densitométrica dos filmes foi realizada no software ImageJ v.1.34.

5.5.7. Descarte E Destino Das Amostras Após Experimentação

Após a morte dos animais, os mesmos foram acondicionados em sacos identificados como “lixo infectante” (no máximo 20 animais por saco) e levados ao freezer de resíduos localizado no Biotério da mesma Instituição.

As carcaças foram recolhidas conforme procedimento interno padrão do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os resíduos tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos foram realizados conforme RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

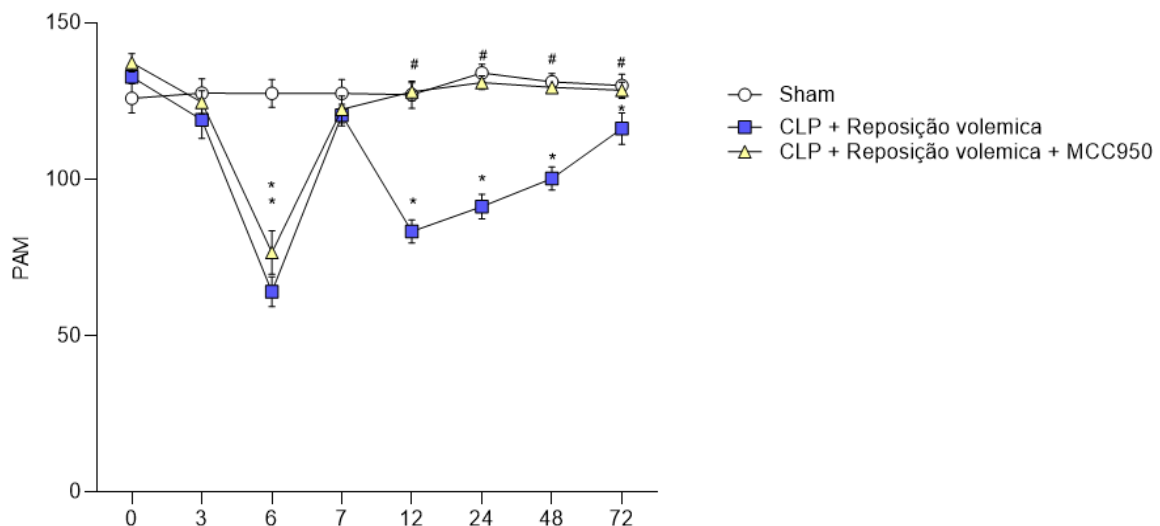
Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade usando o teste de Levene. Para os dados normais e homogêneos, foram utilizados testes paramétricos que consistiram em média \pm EPM e analisados por ANOVA, seguido de teste post hoc Tukey. Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado significativamente estatístico. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Science (SPSS) versão 20.0 e GraphPad Prism versão 10.0.

6. RESULTADOS

6.1. CONFIRMAÇÃO DO CHOQUE SÉPTICO

Para a confirmação do choque séptico foi realizada a análise dos valores da Pressão arterial Média (PAM) e sua variação e verificação dos níveis de lactato. Com a monitorização contínua, foi constatado o desenvolvimento do choque séptico seis horas após o procedimento de indução da sepse, isso foi observado com a queda da PAM característico um quadro de choque nos grupos sépticos quando comparados ao grupo controle. Após a confirmação do choque, ao aplicar a reposição volêmica proposta na clínica para a sepse no grupo CLP+RV e o tratamento clínico associado ao inibidor no grupo CLP+RV+MCC950, observou-se a estabilização da PAM. Foi possível ainda observar que o grupo CLP+RV, nos tempos de 12, 24 e 48hs após a indução da sepse permaneceram em situação de choque, resultado em uma baixa PAM, enquanto o grupo que recebeu o medicamento inibidor (CLP+RV+MCC950) não apresentou mais quadros de hipotensão.

Figura 5: valores da Pressão Arterial Média (PAM).

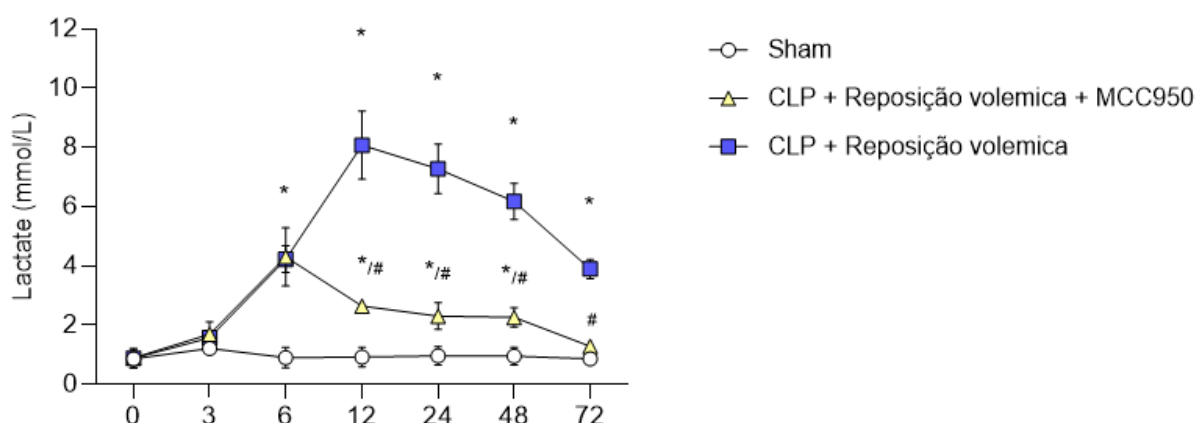


Fonte: da autora, 2024¹.

¹: representação gráfica dos valores e variações da Pressão Arterial Média (PAM) no tempo de 72h após o choque séptico e com a administração de MCC950. PAM em mmHg. As linhas representam a média \pm EPM de cada item ao longo do tempo investigado, 0, 3, 6, 12, 14, 48 e 72 hs sendo a diferença estatística calculada através do teste de ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Foi considerado significativo para valor de * $p < 0,05$ e # $p < 0,05$ ao grupo CLP+RV.

Ainda para realizar a confirmação do choque séptico, foram analisados os níveis de lactato nos grupos experimentais. Sendo possível constatar um aumento significativo dos níveis de lactato em seis horas após o procedimento de indução do choque séptico. Após esse período, ao iniciar o tratamento com reposição volêmica no grupo CLP+RV e no grupo tratamento com reposição volêmica associada ao inibidor (CLP+RV+MCC950), percebe-se uma diminuição dos níveis de lactato nesse último grupo, assemelhando-se ao grupo Sham no tempo de 72hs após a indução do choque séptico.

Figura 6: valores de lactato.



Fonte: da autora, 2024².

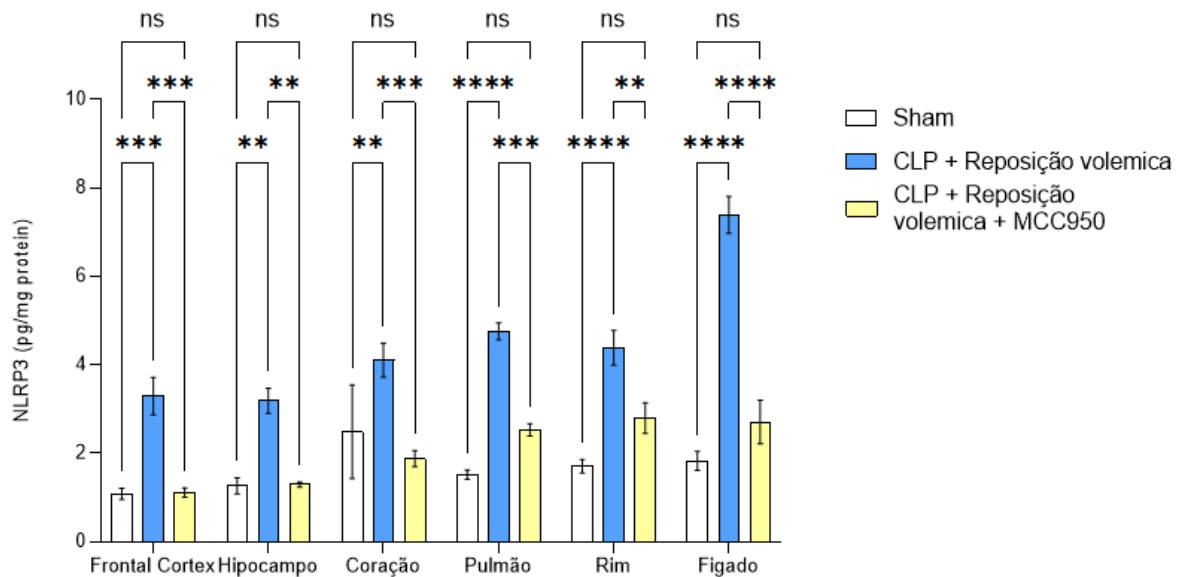
²: **Representação gráfica dos valores e variações dos níveis de lactato no tempo de 72h após o choque séptico e com a administração de MCC950.** Lactato em mmol/L. As linhas representam a média \pm EPM de cada item ao longo do tempo investigado, 0, 3, 6, 12, 14, 48 e 72 hs sendo a diferença estatística calculada através do teste de ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Foi considerado significativo para valor de $*p < 0,05$ e $\#p < 0,05$ ao grupo CLP+RV.

6.2. EXPRESSÃO DE NLRP3

Foi realizada a avaliação da expressão de NLRP3 após 72 horas de choque séptico nos tecidos do hipocampo, córtex pré-frontal, coração, rim, pulmão e fígado. Como resultados, foi possível observar um aumento da expressão desse inflamassoma nos grupos experimentais que foram submetidos ao choque séptico pelo modelo CLP+RV em comparação ao grupo Sham, em todas as estruturas analisadas. No entanto, ao comparar o grupo controle e ao grupo que recebeu tratamento com inibidor MCC950 não foram encontradas alterações significativas.

Interessantemente, ao comparar o grupo CLP+RV+MCC950 com o grupo que recebeu apenas reposição volêmica, pode-se observar uma diminuição desse inflamassoma em todas as estruturas analisadas.

Figura 7: expressão de NLRP3.

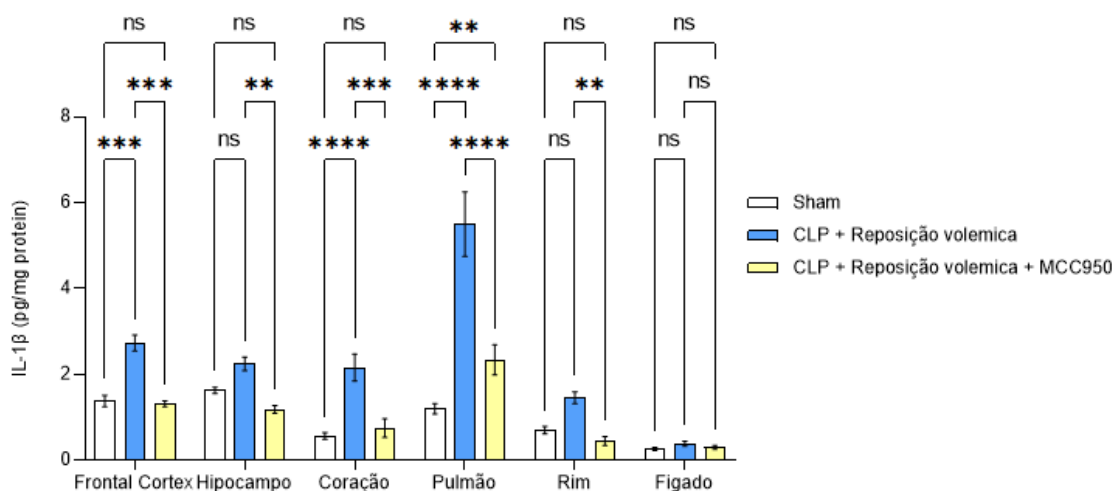


Fonte: da autora³, 2024.

³: Representação gráfica dos valores da expressão do inflamassoma NLRP3 no tempo de 72h após o choque séptico e com a administração de MCC950. NLRP3 em pg/mg no conteúdo total da proteína. As barras representam a média \pm EPM, sendo a diferença estatística calculada através do teste de ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Foi considerado significativo para valor de * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$.

6.3. CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

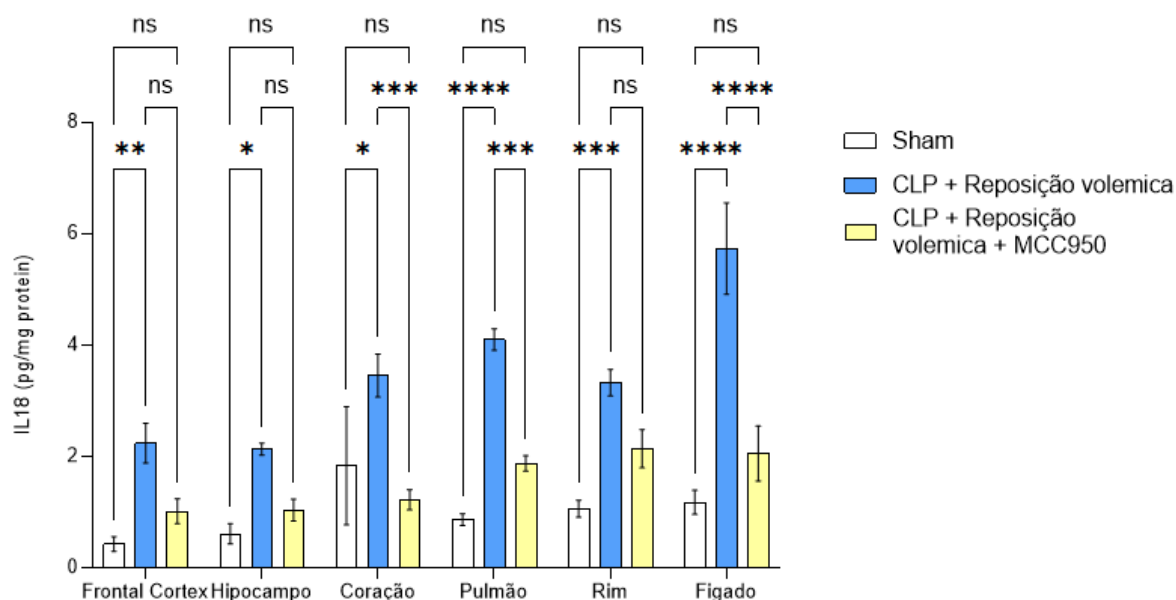
Quanto aos níveis de IL-1B, após o tempo de 72 horas, o grupo CLP+RV apresentou maiores níveis desta citocina nas estruturas de córtex frontal, coração e pulmão quando comparado ao grupo Sham; não foi observado um aumento significativo dessa citocina nos tecidos renal, hepático e no hipocampo quando comparamos esses mesmos grupos. Já no grupo CLP+RV+MCC950, ocorreu uma diminuição dessa citocina nos tecidos de córtex frontal, hipocampo, coração, pulmão e rim quando comparado ao grupo CLP+RV, resultado esse que não foi observado em tecido hepático.

Figura 8: níveis de IL-1B.

Fonte: da autora⁴, 2024.

⁴: Representação gráfica dos níveis da citocina IL-1B nas estruturas do córtex frontal, hipocampo, coração, pulmão, rim e fígado no tempo de 72h após o choque séptico e com a administração MCC950. Os níveis de *IL-1β* em pg/mg no conteúdo total da proteína. As barras representam a média ± EPM, sendo a diferença estatística calculada através do teste de ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Foi considerado significativo para valor de * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$.

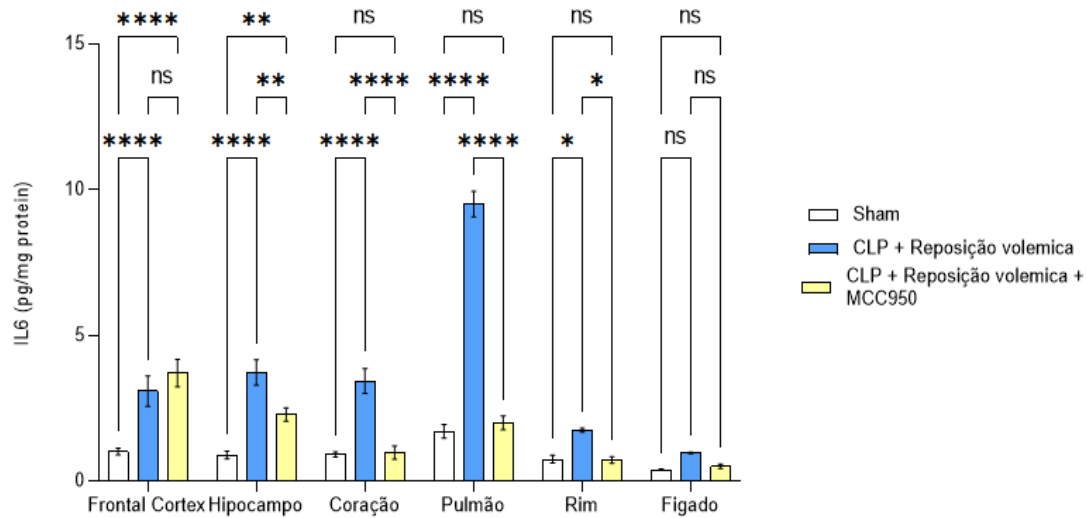
Ao analisar os níveis de IL-18, foi possível observar um aumento nos níveis desta citocina nos tecidos de córtex pré-frontal, hipocampo, coração, pulmão, rim e fígado no grupo CLP+RV, quando comparado ao grupo Sham. Ao analisar o grupo que recebeu o inibidor MCC950 (CLP+RV+MCC950), foi avaliado uma diminuição dos níveis desta citocina nas estruturas de coração, pulmão e fígado quando comparados ao grupo CLP+RV, sendo que os tecidos de córtex frontal, hipocampo e rim não obtiveram diferenças significativas.

Figura 9: níveis de IL-18.

Fonte: da autora⁵, 2024.

⁵: Representação gráfica dos níveis da citocina IL-18 nas estruturas do córtex frontal, hipocampo, coração, pulmão, rim e fígado no tempo de 72h após o choque séptico e com a administração MCC950. Os níveis de *IL-18* em pg/mg no conteúdo total da proteína. As barras representam a média ± EPM, sendo a diferença estatística calculada através do teste de ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Foi considerado significativo para valor de * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$.

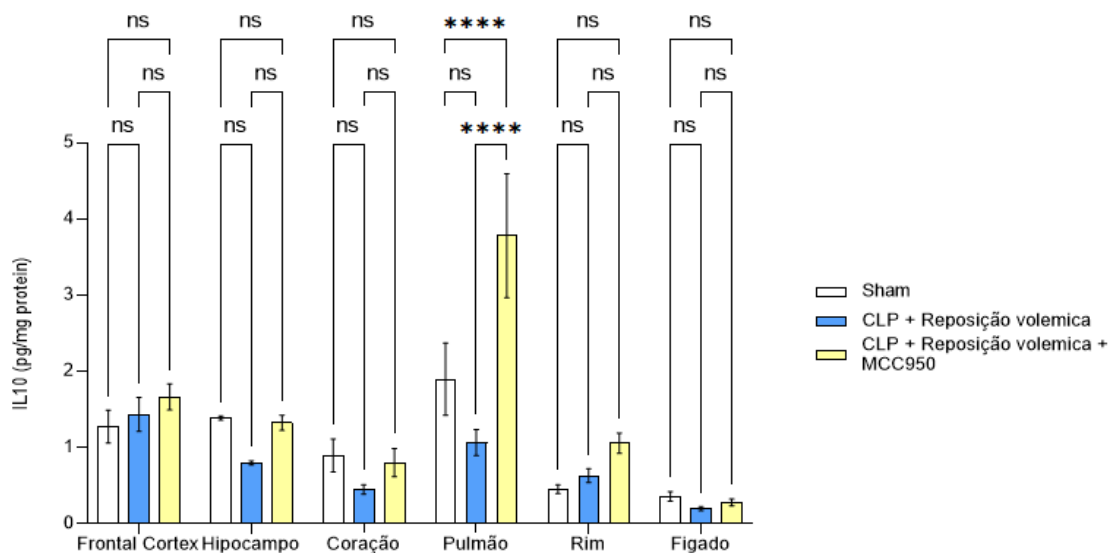
Ao analisar os níveis da IL-6, os animais do grupo CLP+RV apresentaram maiores níveis de IL-6 no córtex frontal, hipocampo, coração, pulmão e rim quando comparado ao grupo Sham, diferença essa que não foi observada no tecido hepático. Além do mais, no hipocampo, coração, pulmão e rim foram observados a diminuição dos níveis desta citocina pró-inflamatória no grupo CLP+RV+MCC950 quando comparados ao grupo CLP+RV, sendo que essa diferença não foi significativa nos tecidos de córtex frontal e fígado.

Figura 10: níveis de IL-6.

Fonte: da autora⁶, 2024.

⁶: Representação gráfica dos níveis da citocina IL-6 nas estruturas do córtex frontal, hipocampo coração, pulmão, rim e fígado no tempo de 72h após o choque séptico e com a administração MCC950. Os níveis de IL-6 em pg/mg no conteúdo total da proteína. As barras representam a média \pm EPM, sendo a diferença estatística calculada através do teste de ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Foi considerado significativo para valor de * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$.

Já na análise dos níveis de IL-10, uma citocina de caráter anti-inflamatório, observou-se, apenas no tecido pulmonar, um aumento de seus níveis no grupo CLP+RV+MCC950, quando comparados aos grupo Sham e ao grupo CLP+RV.

Figura 11: níveis de IL-10.

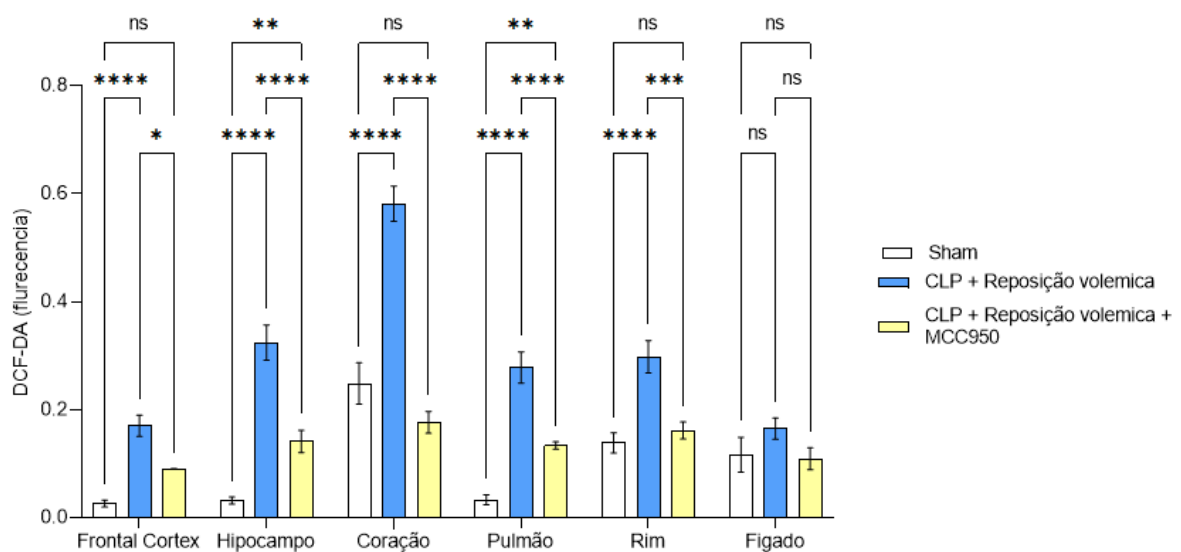
Fonte: da autora⁷, 2024.

⁷: Representação gráfica dos níveis da citocina IL-10 nas estruturas do córtex frontal, hipocampo coração, pulmão, rim e fígado no tempo de 72h após o choque séptico e com a administração MCC950 Os níveis de *IL-10* em pg/mg no conteúdo total da proteína. As barras representam a média \pm EPM, sendo a diferença estatística calculada através do teste de ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Foi considerado significativo para valor de * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$.

6.4. PRODUÇÃO DE ERO

Os animais do grupo choque séptico que apenas receberam a reposição volêmica (CLP+RV) apresentaram um aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) quando comparado ao grupo controle (Sham) nas estruturas do córtex frontal, hipocampo, coração, pulmão, rim; sendo que essa diferença não foi observada no tecido hepático. Já o grupo CLP+RV+MCC950 apresentou uma redução significativa da produção de ERO quando comparado ao grupo submetido ao choque séptico e que recebeu apenas reposição volêmica nas estruturas do córtex frontal, hipocampo, coração, pulmão e rim; sendo que no tecido hepático não houve diminuição significativa.

Figura 12: níveis de DCF-DA.



Fonte: da autora, 2024⁸.

⁸: Representação gráfica da produção de EROs nas estruturas do córtex frontal, hipocampo coração, pulmão, rim e fígado no tempo de 72h após o choque séptico e com a administração MCC950 Os níveis de ERO em fluorescência. As barras representam a média \pm EPM, sendo a diferença estatística

calculada através do teste de ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Foi considerado significativo para valor de $*p < 0,05$, $**p < 0,005$, $***p < 0,0005$ e $****p < 0,0001$.

7. DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que, seis horas após a indução do choque séptico, os animais apresentaram um quadro de hipotensão arterial semelhante ao observado na prática clínica. Esse fator foi escolhido como critério de confirmação do choque devido ao aparecimento rotineiro de hipotensão arterial refratária à fluidoterapia em casos de choque séptico. Após a indução do choque, os grupos foram tratados com reposição volêmica utilizando solução salina, conforme protocolos clínicos. Interessantemente, a hipotensão persiste por até 48 horas nos animais que receberam apenas a reposição volêmica. De acordo com o estudo de Ferreira et al. (2024), a hipotensão induzida pelo choque séptico está associada a outras alterações hemodinâmicas, como taquicardia, redução do fluxo sanguíneo renal e hiporreatividade a vasoconstritores.

Acredita-se que tratamentos que vão além da reposição volêmica podem garantir melhores desfechos clínicos, principalmente visando-se estabilizar os parâmetros hemodinâmicos (ZHONG et al., 2024). Quando o choque séptico já está instalado, a estabilização hemodinâmica deve ser uma prioridade, pois a falta de aporte adequado de oxigênio e a troca de substâncias entre os tecidos podem levar a uma falência orgânica fatal, aumentando a mortalidade em pacientes sépticos (FRAZÃO et al., 2024).

A pesquisa de Ferreira et al. (2024) utilizou inibidores de PDE4, como o roflumilaste, durante a evolução do choque séptico, onde foi observado que os níveis sistêmicos de AMPc aumentaram, atenuando o dano hepático e reduzindo o óxido nítrico. No entanto, o tratamento exacerbou a hipotensão e a taquicardia induzidas por sepse, sem melhorar a hiporreatividade vascular. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores concluíram a necessidade de teste de novas moléculas, pois há dificuldades em encontrar substâncias que gerem um efeito benéfico na hemodinâmica do choque séptico.

No presente estudo, o MCC950 demonstrou um alto potencial hemodinâmico, pois o grupo que recebeu o inibidor apresentou estabilização da PAM, sem desenvolver novos episódios de hipotensão durante o período agudo do choque séptico. Em contraste, o grupo que recebeu apenas reposição volêmica, sem tratamento associado ao inibidor, continuou a apresentar quadros de hipotensão arterial características de choque séptico após 12, 24 e 48 horas de indução da sepse.

O choque séptico pode induzir cardiomiopatias caracterizadas por depressão miocárdica reversível, com incidência variando de 10 a 70% dos casos (BEESLEY et al., 2018).

Além disso, os pacientes geralmente apresentam uma fração de ejeção inferior a 50%, com uma redução superior a 10% em comparação com a linha de base, resultando em hipotensão severa (SATO et al., 2016). No entanto, a recuperação frequentemente ocorre em duas semanas quando o desfecho é favorável (WANG et al., 2021). Adjuvantes como cristaloides, infusões de inibidores inflamatórios e mecanismos que afetam a dinâmica dos vasos, podem ser eficazes na manutenção desses processos (BEESLEY et al., 2018; ZHONG et al., 2024).

Embora o manejo clínico das alterações hemodinâmicas na sepse frequentemente inclua o uso de combinações de medicamentos como milrinona e metoprolol, ou bloqueadores β -adrenérgicos, esses tratamentos não melhoram significativamente as taxas de sobrevivência devido ao seu efeito inotrópico negativo no miocárdio (LIRA et al., 2014; SATO et al., 2016). Em contraste, o MCC950, um inibidor específico do inflamassoma NLRP3, tem se mostrado eficaz nas alterações hemodinâmicas associadas à sepse.

O mecanismo de ação do MCC950 está diretamente ligado ao controle inflamatório, inibindo a produção de IL-1 β e reduzindo a permeabilidade vascular. Isso previne o extravasamento de fluidos, mantendo o volume intravascular e ajudando a estabilizar a pressão arterial. Estudos de Vigneron et al. (2023) e Zou et al. (2024) sugerem que a inibição do NLRP3 pode atenuar significativamente os efeitos adversos da sepse, incluindo a hipotensão, através da modulação da resposta inflamatória e da manutenção da integridade vascular.

Nesse cenário de hipotensão arterial grave, um quadro de hipóxia difusa instala-se no paciente, e o mesmo aciona a via aeróbica que produz grandes quantidades de lactato, outro importante indicador de choque séptico (FRAZÃO, et al., 2024). Apesar de atuar como um importante agente na produção de energia e no metabolismo celular, a acidose láctica é um dos principais indicadores da existência de um quadro séptico ou de choque séptico em pacientes, sendo que os níveis de lactato podem ser utilizados como norteadores do início do tratamento de reposição volêmica (GATTI et al., 2021).

Durante o manejo do quadro séptico, os níveis de lactato podem também atuar como indicadores de melhora clínica e menor taxa de mortalidade. Como abordado por Gatti et al. (2021): “evidências mostraram que a melhora em cerca de 10% da depuração de lactato foi responsável por diminuir a taxa de mortalidade em 11% dos pacientes com diagnóstico de choque séptico”.

Em modelos experimentais de sepse, o uso de biomarcadores para diagnóstico de prognóstico da doença são guias essenciais para os estudos clínicos. Corroborando com a presente pesquisa, Zhai et al. (2017), para animais induzidos à sepse pelo modelo CLP, níveis de lactato acima de $\geq 1,64$ mmol/L podem indicar o processo de choque séptico desses animais. Portanto, os níveis de lactato também foram marcadores utilizados para confirmação do choque séptico nos animais submetidos ao procedimento.

Ao associarmos um medicamento inibidor do inflamassoma NLRP3 ao protocolo de ressuscitação volêmica, foi perceptível o auxílio na melhora clínica desses animais por meio da estabilização hemodinâmica e, por consequência dessa estabilização, diminuição dos valores de lactato. Corroborando com essa hipótese, estudo de Zou et al. (2024) demonstrou que o MCC950 inibiu significativamente a liberação da enzima lactato desidrogenase e o aumento da secreção de IL-1 β em células TM4 induzidas por LPS. Nesse mesmo estudo, a inibição do choque séptico pela atenuação da resposta inflamatória mediada pelo MCC950 mostrou-se importante para a redução dos danos teciduais e a melhoria das taxas de sobrevivência.

A expressão de NLRP3 foi quantificada a fim de investigar sua participação no processo de desenvolvimento do choque séptico, por esse inflamassoma ser repetidamente ligado a diferentes tipos de danos em diversos sistemas durante um processo infeccioso. Por ser relacionado a um agravamento do quadro séptico, numerosos estudos vêm buscando elucidar o potencial da inibição desse inflamassoma como método de controle inflamatório (SHI; TAN; TAN, 2021).

No presente estudo, nos tecidos do hipocampo, córtex pré-frontal, coração, rim, pulmão e fígado dos animais, foi observado um aumento dos níveis de NLRP3, porém o inibidor acabou gerando uma diminuição na produção do inflamassoma. Diminuir esse inflamassoma também causa um impacto direto no melhor controle dos danos orgânicos, o que pode influenciar também no prognóstico e na recuperação de

pacientes acometidos pelo choque séptico, colocando-se então como um considerável potencial terapêutico (FU et al., 2024).

O inflamassoma NLRP3 também auxilia na liberação de importantes citocinas pró-inflamatórias. Conforme citado em Danielski et al. (2020), ao interagir com a proteína ASC, incentivando a ativação da caspase-1 que realiza o estímulo da clivagem de pró-IL-1b e de pró-IL-18, transformando-as em IL-1b e IL-18 maduras, o inflamassoma NLRP3 está sendo diretamente responsável pela liberação dessas importantes citocinas inflamatórias que causam piroptose, aumentando a inflamação e liberando ainda mais citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-18 e IL-6) como encontradas no presente estudo.

Essas citocinas são responsáveis pela disfunção de diversos órgãos durante o processo de choque séptico. Nos pulmões, as citocinas causam a quebra das barreiras intersticial e endotelial, levando a um desequilíbrio ventilatório que causa a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Já no sistema gastrointestinal, essas citocinas são responsáveis por aumentar a permeabilidade da camada interna da mucosa, o que leva a um extravasamento de bactérias intestinais, resultando na disfunção gastrointestinal (SHI; TAN; TAN, 2021).

Além disso, a atividade do NLRP3, associado com a maturação de IL-18 e IL-1B, são responsáveis pela diminuição da perfusão renal, causando a necrose tubular aguda e danos microvasculares; além de poder causar alterações nas células endoteliais que perturbam a barreira hematoencefálica, levando à entrada de toxinas, células inflamatórias e citocinas, que por sua vez causam edema cerebral, destruição de neurotransmissores e estresse oxidativo, causando encefalopatia séptica (SHI; TAN; TAN, 2021; DOMINGUINI et al., 2022).

No presente estudo, os níveis de citocinas IL-1B, IL-18 e IL-6 mostraram que o grupo que recebeu apenas reposição volêmica apresentou níveis elevados de IL-1B no córtex frontal, coração e pulmão, enquanto o grupo que recebeu o inibidor MCC950 mostrou redução dessa citocina nesses tecidos, exceto no fígado. Para a IL-18, houve aumento em todos os tecidos analisados no grupo com reposição volêmica, mas o inibidor MCC950 reduziu seus níveis no coração, pulmão e fígado, sem diferenças significativas no córtex frontal, hipocampo e rim.

Em relação à IL-6, o grupo com reposição volêmica teve níveis mais altos no córtex frontal, hipocampo, coração, pulmão e rim, mas o tratamento com MCC950

diminuiu esses níveis no hipocampo, coração, pulmão e rim, sem diferenças significativas no córtex frontal e fígado. Conforme citado por Resende (2018), as interleucinas pró-inflamatórias estão relacionadas a um pior prognóstico clínico, visto que estas citocinas são responsáveis pelo acarretamento de diversas disfunções orgânicas no paciente séptico; podendo ainda causar alteração da consciência, hipotensão, distúrbios renais, respiratórios e hepáticos.

A IL-18 pode estar envolvida com o estado de hiperglicemia durante a sepse (OPAL et al., 2020). Estudos demonstraram que quanto maior a expressão de IL-18, menor os níveis de glicose e maior os níveis de corticosterona no plasma, interferindo diretamente no metabolismo (YAMASHITA et al., 2017).

A IL-1B, produzida por monócitos e macrófagos, é um potente mediador do choque séptico, sendo correlacionada seu aumento com a alta morbidade e mortalidade, além de induzir o delirium, febre, fadiga muscular (DINARELLO, 2022). Recentemente, o interesse em inibir essas citocinas como estratégia terapêutica na sepse levou ao estudo de bloqueadores específicos. Inibidores como o anakinra, um antagonista do receptor de IL-1B, têm mostrado potencial para atenuar a resposta inflamatória e melhorar a sobrevida em modelos experimentais de choque séptico, melhorando os parâmetros hemodinâmicos, semelhante ao presente estudo (SHAKOORY et al., 2016).

Além disso, o canakinumab, um anticorpo monoclonal que inibe diretamente a IL-1 β , vem sendo investigado como uma abordagem para reduzir a cascata inflamatória associada à sepse, pois seu uso reduziu lactato e parâmetros de danos hepático, renal e pulmonar. Acredita-se que a combinação de inibidores com outras terapias específicas, incluindo antagonistas de IL-1B e IL-18, pode representar uma estratégia promissora para controlar a inflamação severa observada em pacientes com choque séptico (NETEA et al., 2021).

Como o MCC950, foram testados em estudos pré-clínicos e demonstraram capacidade de reduzir a ativação dessas citocinas inflamatórias, contribuindo para uma modulação significativa da resposta inflamatória conforme observado no presente estudo (OPAL et al., 2020). Em modelos de sepse, o uso do MCC950 resultou em uma diminuição dos níveis de IL-1 β e IL-18, reduzindo a lesão tecidual e melhorando a sobrevida (HE et al., 2018).

Uma importante citocina anti-inflamatória, a IL-10, tem a proposta de ser uma citocina contra reguladora da resposta imune inata, podendo atuar na parte de inibição da síntese das citocinas pró-inflamatórias; realiza também a diminuição e duração do processo inflamatório no organismo. Essa citocina, apesar de muito benéfica no controle da cascata inflamatória, quando presente em excesso no organismo pode causar imunossupressão e levar ao óbito. O contrário também ocorre, pois a diminuição dessa citocina no organismo leva a uma possibilidade de aumento da IL-6, o que corrobora com sua função anti-inflamatória, agindo também na redução do dano oxidativo (XU et al., 2019).

A inflamação é um dos fatores que leva a uma maior produção de radicais livres, que por sua definição são átomos ou moléculas que possuem elétrons instáveis, e que quando presentes em excesso no organismo, acabam causando o estresse oxidativo. As ERO são radicais livres extremamente instáveis que resultam do metabolismo anaeróbico, responsáveis pela degradação de estruturas biológicas essenciais para a homeostase do organismo, além de ter o potencial de desenvolver ou aumentar diversas doenças (VELLOSA, 2021).

Essas espécies reativas do oxigênio, quando presentes no organismo em níveis basais, auxiliam nos processos de produção de hormônios, regulação de proteínas e sinalização celular. Porém, a exposição prolongada a altos níveis de ERO pode causar danos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, auxiliando no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e outras complicações pós-choque séptico (YAMACITA, 2014).

As ERO geradas pelas mitocôndrias também atuam como gatilhos que ativam o inflamassoma NLRP3, potencializando assim o desenvolvimento da cascata inflamatória observada durante a sepse (DANIELSKI et al., 2020). Portanto, ao avaliar o grupo experimental que recebeu reposição volêmica, foi possível observar um aumento da produção de ERO quando o comparamos ao grupo controle nas estruturas do córtex frontal, hipocampo, coração, pulmão, rim; sendo que essa diferença não foi observada no tecido hepático. Já no grupo receptor do medicamento inibidor, apresentou-se uma redução significativa da produção de ERO quando comparado ao grupo também submetido ao choque séptico e que não recebeu o medicamento inibidor.

Essa diminuição das ERO beneficia o sistema imunológico e diminui o dano oxidativo presente no choque séptico. Esse estresse oxidativo surge da ativação exacerbada de células imunes, como neutrófilos e macrófagos, que liberam grandes quantidades de ERO para combater patógenos, conseqüentemente o desequilíbrio entre a produção de EROs e a defesa antioxidante, interfere diretamente nas funções hepáticas, renais, pulmonares, cardíacas e principalmente no SNC.

Essa produção excessiva acaba provocando danos às células e tecidos do próprio hospedeiro, intensificando a inflamação e favorecendo a disfunção celular (BUTTERFIELD et al., 2021). Danos esses que interferem em lipídios, proteínas e até mesmo DNA, podendo induzir a morte celular. A peroxidação lipídica, por exemplo, compromete a integridade da membrana celular, levando à perda de homeostase e à morte celular por apoptose (GARCIA et al., 2022).

Esses danos promovem a liberação de fragmentos intracelulares que atuam como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são reconhecidos por receptores imunológicos e amplificam a resposta inflamatória. Conseqüentemente, ocorre uma "tempestade de citocinas", mediada via NLRP3, que agrava o quadro séptico e aumenta o risco de disfunção multiorgânica, especialmente em órgãos sensíveis ao estresse oxidativo, como pulmões, fígado e rins (LÓPEZ et al., 2023).

Outro aspecto relevante no desenvolvimento do dano oxidativo durante a sepse é a ativação do inflamassoma NLRP3 ocasionado pelo dano oxidativo (WU et al., 2020). Essa ativação gera um ciclo vicioso de inflamação e estresse oxidativo, portanto, a inibição do inflamassoma NLRP3 e a redução do estresse oxidativo têm sido propostas como estratégias terapêuticas promissoras para mitigar os danos associados à sepse (HE et al., 2021).

Conforme observado no presente estudo, o aumento de citocinas, ERO e de NLRP3 no sistema nervoso central pode gerar alterações no metabolismo celular que talvez possam ser evitadas com o uso do MCC950. Esses componentes inflamatórios são capazes de induzir estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, resultando em mudanças na neurotransmissão (MESSARIS et al., 2004; COMIM et al., 2011). Estudos observaram que uma elevação das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, nos estágios iniciais da doença no sistema nervoso central pode causar disfunção cerebral, levando a alterações cognitivas subsequentes (COMIM et al., 2011).

Além disso, danos oxidativos em proteínas e lipídios, assim como alterações nos mecanismos antioxidantes, foram observados no tecido cerebral, especificamente no hipocampo e córtex, entre 0 e 96 horas após a indução da sepse por CLP (BARICHELLO et al., 2023). No entanto, Barichello et al. (2023) demonstrou que esses danos podem ser revertidos com o uso combinado de n-acetilcisteína (NAC) e desferoxamina (DFX).

Além dos efeitos observados em modelos animais, há evidências de que pacientes sobreviventes à sepse podem sofrer de incapacidade cognitiva a longo prazo, incluindo problemas de memória, atenção, concentração e perda global da função cognitiva (GORDON et al., 2004; HOPKINS et al., 2005; JACKSON et al., 2004; TOMASI et al., 2016). Barichello et al., (2023) destacou em seu estudo que, mesmo após a alta hospitalar, muitos pacientes continuam a experimentar déficits cognitivos ocasionados por lesões cerebrais, como isquêmicas, hemorragias e micro-abscessos.

Além disso, Singer et al. (2016) indicaram que sobreviventes de sepse frequentemente enfrentam deficiências físicas, psicológicas e cognitivas de longo prazo, necessitando de cuidados contínuos, o que impacta significativamente seu contexto social. O estudo utilizou um modelo de doença de Parkinson em ratos induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Os pesquisadores descobriram que o MCC950 reduziu significativamente a ativação do inflamassoma NLRP3, que por sua vez diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias e melhorou os déficits motores e cognitivo nos ratos.

O tratamento com MCC950 também protegeu os neurônios da degeneração induzida pelo dano oxidativo e pela IL-18 (WANG et al., 2021). Um outro estudo, em modelo de lesão cerebral traumática, tratado com MCC950 reduziu significativamente a ativação do inflamassoma NLRP3, diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias e atenuou o edema cerebral. Neste mesmo estudo, o MCC950 melhorou a função cognitiva e motora dos camundongos (ZHANG et al., 2020).

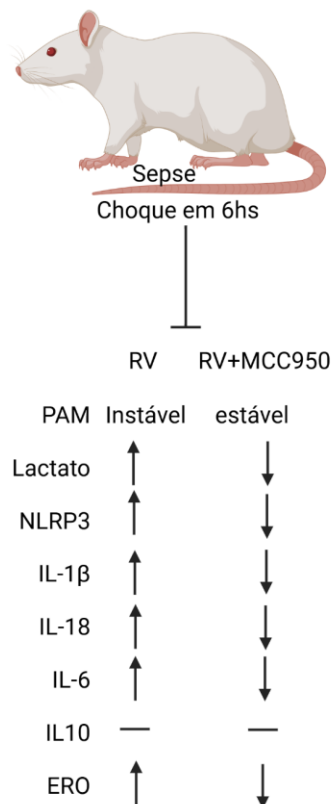
Pesquisas iniciais revelaram que os tecidos de órgãos periféricos de animais sépticos exibiram expressão aumentada de UCP2 (proteína desacopladora 2) que está envolvida principalmente na regulação do potencial da membrana mitocondrial, bem como na geração de ERO (HASS et al., 2021; HUANG et al., 2024). Neste mesmo estudo, com a inibição da proteína, foram observados a diminuição da piroptose mediada por NLRP3 e a diminuição de sua ativação, bem como uma melhor resposta

imunológica a sepse, diminuindo mortalidade e comorbidade (Huang et al., 2024), corroborando com os presentes achados.

Em um outro estudo utilizando o MCC950 em modelo de sepse, observou que o inibidor atenuou significativamente a lesão pulmonar aguda induzida pela sepse, reduzindo a infiltração de neutrófilos, o edema pulmonar e a produção de citocinas pró-inflamatórias (LI et al., 2020). Além disso, o medicamento inibiu a ativação do inflamassoma NLRP3 e diminuiu a apoptose das células epiteliais alveolares, melhorando o processo ventilatório e aumentando a sobrevivência (li et al., 2020).

Um outro estudo em camundongos obesos induzidos por dieta rica em gordura e tratados com MCC950 apresentaram uma resposta melhor à insulina, reduziu a inflamação no tecido adiposo e no fígado, e diminuiu os níveis séricos de IL-1 β e IL-18, além de reduzir a esteatose hepática (KIM et al., 2019). Já o tratamento com MCC950 reduziu a inflamação renal e a fibrose, melhorando a função renal em camundongos (SILVA et al., 2021).

Figura 13: resumo dos resultados encontrados na pesquisa.



Fonte: da autora, 2024.

O MCC950 vem sendo apontado por estudos como um fármaco altamente potente na inibição da ativação do inflamassoma NLRP3, sendo que inicialmente ele foi identificado como um antagonista da IL-1 β e da liberação de citocinas, sendo assim esse medicamento atua diretamente na modulação da inflamação no choque séptico (LI et al., 2022). Estudos sobre os processos de atenuação do NLRP3 são promissores para melhorar a sobrevivência e recuperação de pacientes em UTIs, reduzindo hospitalizações e custos associados, que podem chegar a R\$ 3.692.421,00 no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

A enfermagem desempenha um papel vital na gestão do cuidado, adaptando-se a novas tecnologias e garantindo um fluxo eficiente (COFEN, 2022). Incentivar pesquisas de novas terapias é essencial para reduzir a mortalidade por sepse e melhorar o cuidado dos pacientes (BOTELHO; MARTINS; REIS, 2018). Dentro da gestão do cuidado, é necessário reforçar o papel da enfermagem por meio da mobilização de recursos humanos e materiais, liderança da equipe, busca por soluções, buscando o melhor uso da infraestrutura disponível, garantindo um bom fluxo de pessoas; efetivamente gerindo o processo do cuidado como um todo.

A enfermagem é ainda dinâmica, moldada pelas novas tecnologias e descobertas, mas também dotada de autonomia para participar destas (COFEN, 2022). A pesquisa por novos medicamentos e terapias capaz de tratar efetivamente pacientes com sepse e outras doenças deve ser amplamente encorajada, buscando medicamentos que possuam um alto grau de inovação terapêutica e fomentando novas ações e possibilidades na área da tecnologia e pesquisa, visando mudar o quadro sanitário e a alta mortalidade da sepse no Brasil, não somente para aliviar o sistema financeiro que sofre com os altos gastos para manutenção de pacientes na UTI, mas para garantir mais qualidade e integralidade no processo de cuidado desses pacientes (BOTELHO; MARTINS; REIS, 2018).

8. CONCLUSÃO

O medicamento MCC950 demonstrou-se um potente inibidor do inflamassoma NLRP3, que por sua vez é responsável por desencadear uma resposta inflamatória perante a diversos estímulos nocivos ao organismo, sendo que sua ativação descontrolada pode levar ao desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias, incluindo o agravamento do quadro inflamatório presente no choque séptico.

Ao inibir a atividade do NLRP3, é possível reduzir a produção de moléculas inflamatórias, como as citocinas pró-inflamatórias, e consequentemente diminuir a inflamação causada pelos mesmos. De fato, o medicamento MCC950 se mostrou eficiente na redução dos níveis de citocinas como a IL-1B, IL-6 e IL-18; também demonstrou resultados positivos na redução do dano oxidativo e da produção de ERO nos tecidos cardíaco, pulmonar, no córtex frontal, hipocampo e renal.

O medicamento foi ainda eficiente de forma aguda por promover a estabilização hemodinâmica e redução do lactato, podendo evitar o choque séptico. No entanto é necessário o desenvolvimento de outras pesquisas para corroboração dos resultados obtidos para seu uso clínico, buscando elucidar os meios de ativação do inflamassoma e quais são os possíveis efeitos colaterais envolvidos no uso deste e de outros medicamentos inibidores. Futuramente, o medicamento pode ainda ser testado para a inibição do NLRP3 de forma crônica, visando retardar a progressão de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e o Parkinson, ao reduzir a inflamação cerebral.

O medicamento representa uma nova abordagem terapêutica para doenças inflamatórias crônicas e agudas, sobretudo pode surgir como uma esperança para redução da alta taxa de mortalidade causada pela doença e diminuição das sequelas deixadas pela mesma, visando levar qualidade de vida e reduzindo traumas psicológicos e físicos aos acometidos pela doença.

REFERÊNCIAS

ABREU, Cayo Amaral et al. Choque Séptico: Uma Abordagem Integrada para Manejo Clínico e Terapêutico. *Revista Transdisciplinar Universo da Saúde*, v. 3, n. 3, 2023. Disponível em: <<http://revista.universo.edu.br/index.php?journal=saudeemfoco&page=article&op=view&path%5B%5D=13948>>. Acesso em 06 de junho de 2024.

ARAUJO, João Vitor Gontijo et al. SEPSE e choque séptico-uso de novos biomarcadores e inteligência artificial para diagnóstico precoce, bem como perspectivas atuais de tratamento com uso de imunomoduladores. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 7, p. 52609-59621, 2022. Disponível em: <<file:///C:/Users/Usuario/Downloads/admin,+17+BJD++20-07+Parceria+DOI+261.pdf>>. Acesso em 21 de abril de 2024.

BARICHELLO Tatiana; GENEROSO, Jaqueline; SINGER, M.; DAL-PIZZOL, Felipe. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis-a narrative review. **Crit Care**. 2022 Jan 6;26(1):14. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34991675/>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

BEESELEY S.J. et al. Septic Cardiomyopathy. **Crit Care Med**. 2018;46(4):625–34. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29227368/>>. Acesso em 29 de outubro de 2024.

BIASIO, Nicole Trevisol. Sepsis e choque séptico em adultos de unidade de terapia intensiva: aspectos epidemiológicos e prognósticos. 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ceunsp.edu.br/jspui/handle/123456789/3337>>. Acesso em 20 de abril de 2024.

BOTELHO, Stephanie Ferreira; MARTINS, Maria Auxiliadora Parreiras; REIS, Adriano Max Moreira. Análise de medicamentos novos registrados no Brasil na perspectiva do Sistema Único de Saúde e da carga de doença. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 1, p. 215-228, 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/csc/a/RCSfZ37bRJWwNzpnPMrrM7R/?lang=pt>>. Acesso em 17 de outubro de 2024.

BRAGA, C. Avaliação da resposta imune inata em pacientes adultos com sepse internados na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG). Handle.net, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-B94HQA>>. Acesso em 17 de outubro de 2024.

BUSCH, Katharina et al. Inhibition of the NLRP3/IL-1 β axis protects against sepsis-induced cardiomyopathy. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**. 2021 Dec;12(6):1653-1668. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34472725/>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

CARVALHO, N. V. de Jomaa,; NAZÁRIO, N. O. (2024). Tendência temporal de mortalidade por sepse em idoso no Brasil no período de 2010-2020. **VITTALLE - Revista De Ciências Da Saúde**, 36(1), 24–33. Disponível em: <<https://doi.org/10.14295/vittalle.v36i1.15253>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

COELHO, Marina Melo. Impacto da mobilização precoce na qualidade de vida dos sobreviventes de sepse. 2019. 43 f. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2470>. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/28125>>. Acesso em 26 de abril de 2024.

DANIELSKI, Lucinéia Gainski et al. O Inflamossomo NLRP3 e seu Papel no Desenvolvimento da Sepse. **Inflamação**, 24–31 (2020). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10753-019-01124-9>>. Acesso em 09 de outubro de 2024.

DA SILVA, Ayrles Fernanda Brandão. MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA SEPSE: DA LEGISLAÇÃO À EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA. **Imprensa Universitária**, 2022. Disponível em: <[file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Modelos%20Animais_%20da%20legislacao%20a%20experimentacao%20cientifica%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Modelos%20Animais_%20da%20legislacao%20a%20experimentacao%20cientifica%20(1).pdf)>. Acesso em 17 de outubro de 2024.

DA SILVA, Layane Oliveira et al. ANÁLISE DOS CUSTOS POR INTERNAÇÃO DE PACIENTES COM SEPSE NO BRASIL DE 2011 A 2020. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 103324, 2023. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867023005846>>. Acesso em 17 de abril de 2024.

DINARELLO C.A. et al. The role of IL-1 in disease and implications for therapy. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8439348/>>. Acesso em 30 de outubro de 2024.

FERREIRA, Caíque LS et al. Interação do NLRP3-Inflamassoma com doenças autoimunes: uma revisão de literatura. **Revista Saúde & Diversidade**, v. 4, n. 1, p. 14-21, 2020. Disponível em: <<https://revista.ufr.br/hd/article/view/7519>>. Acesso em 21 de abril de 2024.

FERREIRA, G.A. et al. Cardiovascular effects of Roflumilast during sepsis: Risks or benefits? **Eur J Pharmacol.** 2024 Nov 15;983:177015. doi: 10.1016/j.ejphar.2024.177015. Epub 2024 Sep 26. PMID: 39332796. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39332796/>>. Acesso em 29 de outubro de 2024.

FRAZÃO, Luiz Felipe Neves et al. Análise hemodinâmica no choque séptico: uma revisão sobre os preditores de mortalidade em pacientes chocados. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 4, p. 239-250, 2024. Disponível em: <<https://bjih.emnuvens.com.br/bjih/article/view/1698>>. Acesso em 18 de setembro de 2024.

FU Z. et al. Discovery of Potent, Specific, and Orally Available NLRP3 Inflammasome Inhibitors Based on Pyridazine Scaffolds for the Treatment of Septic Shock and Peritonitis. **J Med Chem.** 2024 Sep 12;67(17):15711-15737. doi: 10.1021/acs.jmedchem.4c01341. Epub 2024 Aug 21. PMID: 39169676. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.4c01341>>. Acesso em 28 de outubro de 2024.

GARCIA, Pedro Celiny Ramos; TONIAL, Cristian Tedesco; PIVA, Jefferson Pedro. Choque séptico em pediatria: o estado da arte. **Jornal de Pediatria**, v. 96, p. 87-98, 2020. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jped/a/SKBc7sRvKmSLM53QYQ7vySF/?lang=pt>>. Acesso em 20 de abril de 2024.

GATTI, Júlia Domingues et al. Avaliação da hiperlactatemia em pacientes com diagnóstico de choque séptico. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 8, p. e8507-e8507, 2021. Disponível em: <<https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/8507>>. Acesso em 13 de outubro de 2024.

GAUER, Robert; FORBES, Damon; BOYER, Nathan. Sepsis: diagnosis and management. **American family physician**, v. 101, n. 7, p. 409-418, 2020. Disponível em: <<https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2020/0401/p409.html>>. Acesso em 27 de março de 2024.

GAZEL, Fernando Senra. DESAFIOS E AVANÇOS NO MANEJO DA SEPSE: UMA REVISÃO ABRANGENTE À LUZ DAS DIRETRIZES DO ILAS. **Repositório de Trabalhos de Conclusão de Curso**, 2023. Disponível em: <<https://www.pensaracademico.unifacig.edu.br/index.php/repositoriotcc/article/view/4108>>. Acesso em 21 de abril de 2024.

HASS, Daniel T. et al. Uncoupling proteins in the mitochondrial defense against oxidative stress. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 83, p. 100941–100941, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1350946221000021>>. Acesso em 04 de novembro de 2024.

HUANG B. et al. UCP2 knockout exacerbates sepsis-induced intestinal injury by promoting NLRP3-mediated pyroptosis. **Int Immunopharmacol**. 2024 Nov 15;141:112935. doi: 10.1016/j.intimp.2024.112935. Epub 2024 Aug 18. PMID: 39159561. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39159561/>>. Acesso em 05 de novembro de 2024.

HUANG C. et al. Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**. 2020;395:497–506. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31986264/>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

WANG, Y. et al. MCC950 Attenuates Neuroinflammation Induced by NLRP3 in Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 5, p. 1242-1253, 2021. DOI: 10.1007/s11064-021-03487-3. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s12264-023-01023-y>>. Acesso em 04 de novembro de 2024.

JACOBI, Judith. The pathophysiology of sepsis - 2021 update: Part 2, organ dysfunction and assessment. **Am J Health Syst Pharm**. 2022 Mar 7;79(6):424-436. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34651652/>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

KELLEY N. et al. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **Int J Mol Sci**. 2019 Jul 6;20(13):3328. doi: 10.3390/ijms20133328. PMID: 31284572; PMCID: PMC6651423. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31284572/>>. Acesso em 24 de abril de 2024.

KIM, H. J. et al. NLRP3 Inflammasome Inhibition with MCC950 Improves Insulin Sensitivity and Inflammation in a Mouse Model of Obesity. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 12345, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-48862-1. Disponível em: <<https://www.nature.com/srep/>>. Acesso em 04 de novembro de 2024.

LEE S. et al. inflammasome deficiency protects against microbial sepsis via increased lipoxin B 4 synthesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 196, 713–726. 2017. Disponível em: <<https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201604-0892OC>>. Acesso em 24 de abril de 2024.

LI H. et al. Therapeutic potential of MCC950, a specific inhibitor of NLRP3 inflammasome. **Eur J Pharmacol**. 2022 Aug 5;928:175091. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175091. Epub 2022 Jun 14. PMID: 35714692. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35714692/>>. Acesso em 26 de abril de 2024.

LI, X. et al. MCC950, a NLRP3 Inflammasome Inhibitor, Attenuates Sepsis-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Inflammation*, v. 43, n. 2, p. 741-752, 2020. DOI: 10.1007/s10753-020-01262-9. Disponível em: <<https://link.springer.com/journal/10753>>. Acesso em 05 de novembro de 2024.

LINS, Anete Nailane Silva et al. Perfil epidemiológico das internações por sepse no Brasil entre 2017 e 2021. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e592111134048-e592111134048, 2022. Disponível em

<<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/34048>>. Acesso em 01 de abril de 2024.

LIRA A, Pinsky MR. Should beta-blockers be used in septic shock? *Crit Care*. 2014;18(3):304. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4057155/#:~:text=Background,negative%20inotropic%20and%20hypotensive%20effects.>>. Acesso em 29 de outubro de 2024.

LIU et al. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options. **Mil Med Res**. 2022 Oct 9;9(1):56. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36209190/>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

LUO, R.; LI, X.; WANG D. Reprogramming Macrophage Metabolism and its Effect on NLRP3 Inflammasome Activation in Sepsis. **Front Mol Biosci**. 2022 Jun 29;9:917818. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9276983/>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

MACÍAS, Jorge Ortiz et al. Caracterización epidemiológica de pacientes con sepsis y choque séptico en el Hospital General de zona # 2, Aguascalientes. Repositorio Bibliográfico, 2024. Disponível em: <<http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/2993>>. Acesso em 05 de outubro de 2024.

Ministério da Saúde, Brasil. Dia Mundial da Sepse: Brasil tem alta taxa de mortalidade por sepse entre os países em desenvolvimento, 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-sudeste/hu-ufjf/comunicacao/noticias/2023/dia-mundial-da-sepse-brasil-tem-alta-taxa-de-mortalidade-por-sepse-dentre-os-paises-em-desenvolvimento>>. Acesso em 17 de outubro de 2024.

MUNROE E. S. et al. Evolving Management Practices for Early Sepsis-induced Hypoperfusion: A Narrative Review. *Am J Respir Crit Care Med*. 2023 May 15;207(10):1283-1299. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36812500/>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

NASCIMENTO, D. P. C. do; CUSTÓDIO, A. D.; ANDRADE, O. V.; SILVA, F. R. A. .; MACÊDO, L. P. ALTERAÇÕES VASCULARES EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE SEPSE: EPIDEMIOLOGIA CLÍNICA E ASPECTOS DE SAÚDE PÚBLICA. **Boletim de Conjuntura (BOCA)**, Boa Vista, v. 16, n. 48, p. 164–179, 2023. DOI: 10.5281/zenodo.10313649. Disponível em: <https://revista.ioles.com.br/boca/index.php/revista/article/view/2780>. Acesso em: 3 jun. 2024.

NETEA M.G. et al. IL-18 as a therapeutic target in sepsis. **Immunol Rev.** 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/13652567>>. Acesso em 30 de outubro de 2024.

OLIVEIRA, Lara Sousa Cruz de et al. Identificação de genes diferencialmente expressos em pacientes com sepse e a correlação com o perfil inflamatório: análise in silico de potenciais biomarcadores. 2023. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/handle/ri/37806>>. Acesso em 17 de outubro de 2024.

OPAL S.M. et al. Role of IL-18 in sepsis-associated inflammatory responses and organ injury. **J Infect Dis.** 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid>>. Acesso em 30 de outubro de 2024.

PACHECO, Fabiana dos Santos. Envolvimento da via IL-10/IL-10R na resposta imunológica durante o curso da infecção pelo *Mycobacterium leprae*. 2019. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/43239>>. Acesso em 17 de outubro de 2024.

PASCHOAL, Giselle Mota dos Santos. Sepse e choque séptico: aspectos fisiopatológicos e a importância do glicocálix. 2021. Disponível em: <<https://dspace.uniceplac.edu.br/handle/123456789/641>>. Acesso em 20 de abril de 2024.

Portaria nº 1263 do Conselho Federal de Enfermagem, de 30 de agosto de 2022 (BR). Disponível em: <<https://consultapublica.cofen.gov.br/cofen/30/proposicao>>. Acesso em 17 de outubro de 2024.

REIS, Henrique Veloso et al. Choque séptico: diagnóstico e uso de norepinefrina e vasopressina. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 3, p. e6986-e6986, 2021. Disponível em: <<https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/6986>>. Acesso em 20 de abril de 2024.

SALOMÃO, R. et al. Sepsis: evolving concepts and challenges. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 52(4), e8595. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1414-431X20198595>>. Acesso em 27 de março de 2024.

SANTOS, Christyan Sannder; NUNES, Carlos Pereira. Sepsis 3: Novas definições, aplicabilidade, vantagens e desvantagens. **Revista de Medicina de Família e Saúde Mental**, v. 1, n. 1, 2019. Disponível em <<https://revista.unifeso.edu.br/index.php/medicinafamiliasaudemental/article/view/1588>>. Acesso em 01 de abril de 2024.

SANTOS, Emanuelle de Souza; ZARIFE, André Sant'Anna; ABREU, Cayo Amaral. Comparação dos Choques Séptico, Hipovolêmico e Cardiogênico: Fisiopatologia, Abordagens Terapêuticas e Prognóstico. *Revista Transdisciplinar Universo da Saúde*, v. 3, n. 3, 2024. Disponível em: <<http://revista.universo.edu.br/index.php?journal=saudeemfoco&page=article&op=view&path%5B%5D=13949>>. Acesso em 06 de outubro de 2024.

SATO R. et al. Prevalence and risk factors of sepsis-induced cardiomyopathy: a retrospective cohort study. **Medicine**. 2016;95(39):e5031. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27684877/>>. Acesso em 29 de outubro de 2024.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303873/>>. Acesso em 05 de novembro de 2024.

SHAKOORY B. et al. Interleukin-1B receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of macrophage activation syndrome: reanalysis of a prior trial. **Crit Care Med**. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26584195/>>. Acesso em 30 de outubro de 2024.

SHI, J. et al. NLRP3 inflammasome contributes to endotoxin-induced coagulation. **Thromb Res.** 2022 Jun;214:8-15. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35421682/>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

SHI, X.; TAN, S.; TAN, S. NLRP3 inflammasome in sepsis (Review). **Mol Med Rep.** 2021 Jul;24(1):514. doi: 10.3892/mmr.2021.12153. Epub 2021 May 13. PMID: 33982766. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33982766/>>. Acesso em 24 de abril de 2024.

SILVA, Adriane Gomes de Souza; MELO, Caroline Cavalcante de. Sepse. 2024. fls. 276-280. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2023. **Rev. Urgências e Emergências Médicas**, capítulo 54. São Paulo: Sarvier Editora, 2023. Disponível em: <<https://www.repositorio.ufal.br/handle/123456789/13144>>. Acesso em 21 de abril de 2024.

SILVA, A. R. et al. MCC950, um inibidor do inflamassoma NLRP3, melhora a função renal em modelos de doença renal crônica. **Journal of Renal Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 123-134, 2021. DOI: 10.1016/j.jrn.2020.08.002. Disponível em: <<https://www.jrnjournal.org/>>. Acesso em 03 de novembro de 2024.

SINGER, Mervyn et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2492881>>. Acesso em 01 de abril de 2024.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo et al. Sepse: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, p. 207-216, 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbti/a/gdrF6hVjgxcfYc3LWNxxCQS/#>>. Acesso em 01 de abril de 2024.

VELLOSA, José Carlos Rebuglio et al. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021. Disponível em: <<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/23823>>. Acesso em 17 de outubro de 2024.

VIGNERON, C.; PY, B. F.; MONNERET, G.; VENETE, F. The double sides of NLRP3 inflammasome activation in sepsis. **Clin Sci (Lond)**. 2023 Mar 15;137(5):333-351. doi: 10.1042/CS20220556. PMID: 36856019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36856019/>>. Acesso em 24 de abril de 2024.

XU, Yujun et al. SPIONs enhances IL-10-producing macrophages to relieve sepsis via Cav1-Notch1/HES1-mediated autophagy. *International journal of nanomedicine*, p. 6779-6797, 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2147/IJN.S215055>>. Acesso em 31 de outubro de 2024.

WANG B. et al. The influences of early application of β blocker on serum inflammatory factors and occurrence of heart injury in patients with sepsis. **J China J Emerg Resusc Disaster Med**. 2021;16:907–10. Disponível em: <<https://journals.aps.org/prl/abstract/10.1103/PhysRevLett.16.907>>. Acesso em 29 de outubro de 2024.

YAMACITA, Fabiane Yuri Borin. Avaliação da participação do Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α na hiperalgesia e inflamação induzidas por doador de ânion superóxido. 2013. 82 p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.uel.br/items/4c364824-b268-45be-8426-1db351f08049>>. Acesso em 17 de outubro de 2024.

YAMASHITA, Hayato et al. Interleukin-18 Reduces Blood Glucose and Modulates Plasma Corticosterone in a Septic Mouse Model. **SHOCK**. 47(4):p 455-462, April 2017. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000747. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27648697/>>. Acesso em 30 de outubro de 2024.

ZARBOCK, A.; KOYNER, J. L.; GOMEZ, H.; PICCKERS, P.; FORNI, L. Acute Disease Quality Initiative group. Sepsis-associated acute kidney injury-treatment standard. **Nephrol Dial Transplant**. 2023 Dec 20;39(1):26-35. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37401137/>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

ZHAI, Xiaozhu et al. Lactate as a potential biomarker of sepsis in a rat cecal ligation and puncture model. **Mediators of inflammation**, v. 2018, n. 1, p. 8352727, 2018.

Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2018/8352727>>. Acesso em 02 de outubro de 2024.

ZHANG, Y. et al. MCC950 Prevents Neuroinflammation and Cognitive Impairment in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 123, 2020. DOI: 10.1186/s12974-020-01733-5. Disponível em: <<https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/>>. Acesso em 05 de novembro de 2024.

ZHONG, L.. et al. Metoprolol use is associated with improved outcomes in patients with sepsis-induced cardiomyopathy: an analysis of the MIMIC-IV database. **BMC Cardiovasc Disord.** 2024 Oct 24;24(1):587. doi: 10.1186/s12872-024-04271-6. PMID: 39448900. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39448900/>>. Acesso em 28 de outubro de 2024.

ZHOU J. et al. Cadmium exposure induces pyroptosis of TM4 cells through oxidative stress damage and inflammasome activation. **Ecotoxicol Environ Saf.** 2024 Jan 15;270:115930. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.115930. Epub 2024 Jan 6. PMID: 38184979. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651324000046>>. Acesso em 27 de outubro de 2024.

ZHU, C. L. et al. Dysregulation of neutrophil death in sepsis. **Front Immunol.** 2022 Aug 18;13:963955. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9434116/>>. Acesso em 05 de junho de 2024.

ZOU H. et al. Cynaroside regulates the AMPK/SIRT3/Nrf2 pathway to inhibit doxorubicin-induced cardiomyocyte pyroptosis. **J Zhejiang Univ Sci B.** 2024 Sep 12;25(9):756-772. doi: 10.1631/jzus.B2300691. PMID: 39308066; PMCID: PMC11422794. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 29 de outubro de 2024.

ANEXO (S)

ANEXO 1: aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) para realização da pesquisa.



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **24/08/2021**.

Título do projeto	AVALIAÇÃO DO USO DO INIBIDOR DO INFLAMASSOMA NLRP3 E A MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO CHOQUE SÉPTICO
Project title	EVALUATION OF THE USE OF THE NLRP3 INFLAMMASOMA INHIBITOR AND THE MODULATION OF INFLAMMATION IN SEPTIC SHOCK
Número do protocolo Protocol number	53/2021
Pesquisador principal Principal Investigator	Felipe Dal-Pizzol
Pesquisadores Researchers	Monique Michels, Mariane Rocha Abatti, Heloisa de Medeiros Borges, Luana Cucker, Diogo Domingui, Rodrigo da Silva Dias, Amanda Indalécio Goulart.
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2021 a 01/09/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	60 dias / 200-300g
Número de animais	Masculino 284
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 24 de agosto de 2021

Josiane Budni
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA