Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica

RAZÃO ENTRE NEUTRÓFILO E LINFÓCITOS E ENTRE PLAQUETAS E LINFÓCITOS COMO BIOMARCADORES EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE[1]

NEUTROPHIL TO LYMPHOCYTES RATIO AND PLATELETS TO LYMPHOCYTES RATIO AS BIOMARKERS IN EXPERIMENTAL SEPSIS MODEL

Maicon Machado Sulzbacher[2], Lucas Machado Sulzbcher[3], Felipe Rafael Passos[4], Matias Nunes Frizzo[5], Mirna Stela Ludwig[6], Thiago Gomes Heck[7]

[1] Trabalho de pesquisa realizado pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Departamento de Ciências da Vida - DCVida, UNIJUÍ.
[2] Enfermeiro graduado na Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUÍ. Mestre em Atenção Integral a Saúde (UNICRUZ - UNIJUÍ). Integrante do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUÌ (GPeF).
[3] Acadêmico do Curso de Enfermagem - UNIJUÍ, Bolsista PROBIC/FAPERGS, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF.
[4] Acadêmico do curso de Fisioterapia - UNIJUÍ, Bolsista PIBIC/CNPq, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF.
[5] Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS)- UNIJUÍ/UNICRUZ, professora do Departamento de Ciências da Vida-UNIJUÍ; Docente do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUÍ - Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUÍ.
[6] Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS)- UNIJUÍ/UNICRUZ, professora do Departamento de Ciências da Vida-UNIJUÍ; Docente do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUÍ - Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUÍ.
[7] Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS)- UNIJUÍ/UNICRUZ, professora do Departamento de Ciências da Vida-UNIJUÍ; Docente do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUÍ - Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUÍ.

INTRODUÇÃO

A sepse é uma infecção sistêmica que leva a disfunção múltipla dos órgãos, com uma alta taxa de morbimortalidade hospitalar (MORELLO et al., 2019). A identificação precoce de modificações de parâmetros na sepse possibilita um melhor prognóstico na doença. O monitoramento do leucograma e plaquetograma são parâmetros hematológicos que refletem de forma rápida as modificações ocasionadas pelo processo infeccioso, e podem ser preditores do diagnóstico e gravidade do quadro de sepse (GUCYETMEZ; ATALAN, 2016).
As modificações hematológicas da sepse podem ser observadas a partir de relações realizadas entre a contagem diferencial no leucograma, como a razão entre neutrófilo e linfócito (RNL), e ainda somadas à observação do plaquetograma, com o volume plaquetário médio (VPM), e o seu número relativo e absoluto, além da razão entre VPM e a contagem de plaquetas (VPM/CP), que

juntamente com a avaliação entre a interação de linfócitos com plaquetas (razão entre plaquetas e linfócitos - RPL) podem ser biomarcadores da sepse em pacientes (DJORDJEVIC et al., 2018).
A pesquisa com modelos experimentais de sepse em camundongos tem trazido informações quanto a fisiopatologia da doença, o que possibilita posterior terapias inovadoras (GUILLON et al., 2019). O modelo experimental de peritonite com solução fecal em camundongo mimetiza alguns pontos que apontam a gravidade da sepse em pacientes (SULZBACHER et al., 2018). Existe diferença proporcional na contagem diferencial dos leucogramas de humanos e camundongo. O ser humano possui uma maior proporção de células correspondentes à resposta imunológica inata a infecção bacteriana, como neutrófilos (40 - 80 %), e uma proporção menor de linfócitos (20 - 40%) responsáveis pela resposta imune adaptativa (FAILACE, 2009). Já a proporção de células diferenciadas para a resposta imune inata dos camundongos é menor (cerca 27% de neutrófilos) do que a adaptativa (cerca de 68% de linfócitos) (BARBOSA et al., 2017).
Tendo em vista esta diferença proporcional na contagem diferencial entre humanos e camundongos, neste estudo investigamos se a relação neutrófilo linfócito, e a razão entre plaquetas e linfócitos podem ser biomarcadores em modelo experimental de sepse em camundongos.

METODOLOGIA

Animais

Neste estudo foram utilizados 15 camundongos da linhagem C57BL/6 com 90 a 150 dias, provenientes do Biotério do Departamento de Ciências da Vida (DCVida) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ) mantidos sob condições adequadas para animais de laboratório. Os procedimentos experimentais com os animais foram realizados no laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUÍ (LEBio), (CEUA 048/2016).

Delineamento experimental

Os animais foram divididos em dois grupos: Controle (n = 7) e Sepse (n = 8). Para a indução da sepse, foi preparada solução fecal com fezes frescas dos animais envolvidos no estudo em solução fisiológica 0,9% com uma concentração de 20% (200mg/ml), sendo administrada via intraperitoneal na dose de 1 mg/g, enquanto os animais do grupo Controle receberam solução fisiológica 0,9% (5µL/g) (SULZBACHER et al., 2018). Os animais foram avaliados quanto a contagem absoluta e diferencial de leucócitos e plaquetograma, antes (Tempo zero) e 4, 12 e 24 horas após a indução da sepse.

Análise hematológica

Para análise do hemograma foi coletado sangue com punção na parte distal da cauda dos camundongos (10 µL), em microcubo, diluídas 1:3 com solução salina 0,9 %, com 1µL de anticoagulante (EDTA). Em seguida foram avaliadas utilizando o analisador hematológico Micros 60 (Horiba), seguindo as recomendações do fabricante. Após, foram realizadas distensões hematológicas em lâmina, para contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, linfócitos e monócitos), corados com coloração do tipo panótico (Newprov), que foram analisadas por profissional com experiência na área (BEDELL; BUSH, 1985).

Os dados foram expressos em média ± desvio padrão, e a análise estatística foi realizada com o teste de ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Bonferroni, considerando um nível de significância de 5% (*p< 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sepse levou a diminuição da contagem absoluta e relativa de plaquetas (Figura 1A,B). A bacteremia pode levar a agregação plaquetária, assim como a hemofagocitose por leucócitos (KARAKIKE; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2019), acarretando a diminuição da contagem absoluta e relativa de plaquetas (BEDET et al., 2017). O reconhecimento de bactérias gram-negativas, como as encontradas nas fezes de camungongos, podem ser reconhecidas pelos receptores do tipo Toll (TLRs) plaquetários, com posterior aumento da quantidade de grânulos, o que aumenta a reatividade e a superfície discoide desta célula, levando ao aumento do VPM (TAMELYTĖ et al., 2019), como verificado em nosso estudo (Figura 1C).
O aumento do VPM, somado a diminuição plaquetária, incide na elevação da VPM/CP, que pode ser considerada um preditor da formação de microtrombos e disfunção plaquetária no grupo Sepse (Figura 1D), o que indica fragilidade na regulação da homeostasia vascular e da coagulação na infecção sistêmica (DJORDJEVIC et al., 2018).

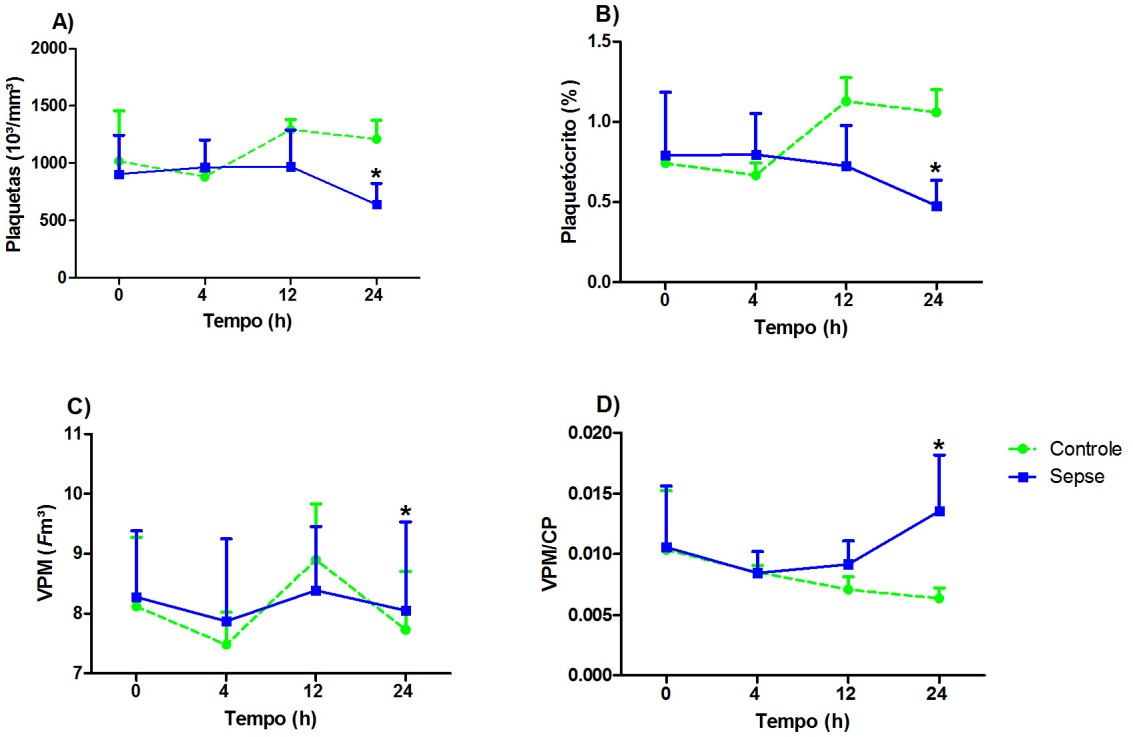

Figura 1. Contagem absoluta de plaquetas sanguíneas (A), contagem relativa de plaquetas (B),

volume plaquetário médio (VPM) e razão entre VPM e contagem de plaquetas (VPM/Plaquetas) (D), em 24 horas após indução de sepse com solução fecal 20% (1 mg/g).

O processo infeccioso gera uma resposta imune do hospedeiro, como observado pela elevação da contagem neutrofílica após 12 horas, retornando à normalidade 24 horas após a indução da sepse (Figura 2A). A partir do tempo 12 horas o grupo sepse apresentou diminuição de linfócitos, o que se repetiu 24 horas após a indução da doença, desta vez, acompanhada pela diminuição de monócitos circulantes (figura 2B,C). Esta diminuição na contagem diferencial repercutiu da mesma forma na contagem absoluta do leucograma (leucócitos totais) ao final do experimento (Figura 2D).
A elevação imediata neutrofílica para combater a infecção bacteriana, somada a exacerbada apoptose, e diminuição dos linfócitos (MARTINS et al., 2019), levaram ao aumento da RNL nos tempos 12 e 24 horas (Figura 2E). Esta disfunção tanto das células imunológicas, quanto das plaquetas, pode ser utilizada, e observada como biomarcador inflamatório através do aumento da RPL (DJORDJEVIC et al., 2018), o que pode ser verificado em nosso estudo (Figura 2F).

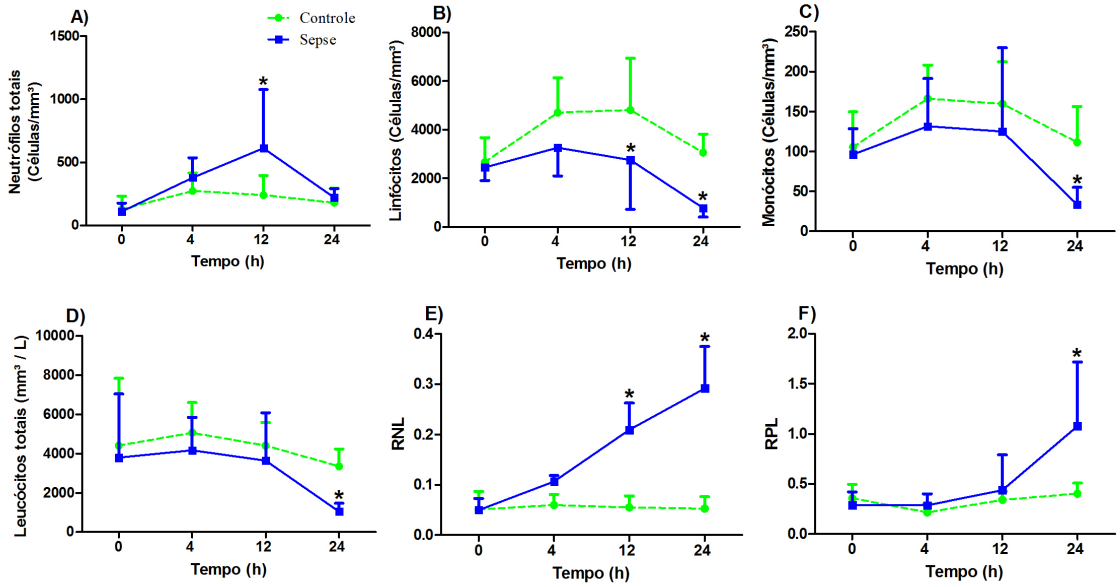

Figura 2. Contagem diferencial (A-C) e total (D) de leucócitos sanguíneos, e razão entre a contagem de neutrófilos-linfócitos (RNL) (D), e plaquetas-linfócitos (RPL) (E), em 24 horas após a indução da sepse por solução fecal 20% (1mg/g).

CONCLUSÃO

O monitoramento das RNL e RPL pode uma ferramenta útil como biomarcadores da gravidade da sepse em modelo experimental

Palavras-chave: Plaquetas; Linfócitos; sepse.

Keywords: Blood platelets; Lymphocytes; Sepsis .

REFERÊNCIAS:

BARBOSA, B. D. S. et al. Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c Haematological and Biochemical Profile of Balb-c Mice. Acta Sientiae Veterinariae, v. 55, n. April, p. 1–5, 2017.

BEDELL, S. E.; BUSH, B. T. Erythrocyte sedimentation rate. From folklore to facts. The American journal of medicine, v. 78, n. 6 Pt 1, p. 1001–9, jun. 1985.

BEDET, A. et al. Mechanisms of thrombocytopenia during septic shock: a multiplex cluster analysis of endogenous sepsis mediators. Shock, v. 55, n. 2, p. 664–690, 2017.

DJORDJEVIC, D. et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Monocyte-to-Lymphocyte Ratio, Platelet-to-Lymphocyte Ratio, and Mean Platelet Volume-to-Platelet Count Ratio as Biomarkers in Critically Ill and Injured Patients: Which Ratio to Choose to Predict Outcome and Nature of Bacte. Mediators of Inflammation, v. 2018, p. 1–15, 2018.

GUCYETMEZ, B.; ATALAN, H. K. C-reactive protein and hemogram parameters for the non-sepsis systemic inflammatory response syndrome and sepsis: What do they mean? PLoS ONE, v. 11, n. 2, p. 1–9, 2016.

GUILLON, A. et al. Preclinical septic shock research: why we need an animal ICU. Annals of Intensive Care, v. 9, n. 1, p. 66, 2019.

KARAKIKE, E.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. Macrophage activation-like syndrome: A distinct entity leading to early death in sepsis. Frontiers in Immunology, v. 10, n. JAN, 2019.

LANCÉ, M. D. et al. Mean platelet volume as a diagnostic marker for cardiovascular disease: drawbacks of preanalytical conditions and measuring techniques. Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, v. 18, n. 6, p. 561–8, 30 nov. 2012.

MARTINS, E. C. et al. Razão neutrófilo-linfócito no diagnóstico precoce de sepse em unidade de terapia intensiva: um estudo de caso-controle. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v. 31, n. 1, p. 63–70, 2019.

MORELLO, L. G. et al. Assessment of clinical and epidemiological characteristics of patients with and without sepsis in intensive care units of a tertiary hospital. Einstein (São Paulo), v. 16, n. 4, p. 1–6, 2019.

RENATO FAILACE. Hemograma. Manual de interpretação. 5. ed. Porto Alegre (RS): [s.n.].

SULZBACHER, M. M. et al. Efeitos do tratamento com glutamina via enteral em modelo animal de sepse. Saúde (Santa Maria), v. 44, n. 2, p. 1–10, 2018.

TAMELYTĖ et al. Early Blood Biomarkers to Improve Sepsis/Bacteremia Diagnostics in Pediatric Emergency Settings. Medicina, v. 55, n. 4, p. 99, 2019.