UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ALINE HALFELD FERNANDES VALE

**Efeito da riboflavina na disfunção orgânica e na mortalidade por sepse grave e
choque séptico: estudo experimental.**

Ribeirão Preto
2020

ALINE HALFELD FERNANDES VALE

Efeito da riboflavina na disfunção orgânica e na mortalidade por sepse grave e choque séptico: estudo experimental.

Versão Corrigida

(A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD))

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula C. P. Carlotti

Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Volume único

Ribeirão Preto
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Vale, Aline Halfeld Fernandes

Efeito da riboflavina na disfunção orgânica e na mortalidade por sepse grave e choque séptico: estudo experimental. Ribeirão Preto, 2020.

114 p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Carlotti, Ana Paula de Carvalho Panzeri.

1. Sepses. 2. Riboflavina. 3. Resposta inflamatória. 4. Disfunção orgânica 5. Estresse oxidativo.

Folha de aprovação

VALE, Aline Halfeld Fernandes

Efeito da riboflavina na disfunção orgânica e na mortalidade por sepse grave e choque séptico: estudo experimental.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Aprovado em: 16/07/2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Werther Brunow de Carvalho

Instituição: FM-USP

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho

Instituição: FMRP-USP

Prof. Dr. Jose Simon Camelo Junior

Instituição: FMRP-USP

Dedico este trabalho aos meus alicerces:

a Deus por me proteger e permitir alcançar os objetivos
almejados;

aos meus pais, Isabel e Aluísio, pelo apoio e amor incondicional,
aos quais devo tudo o que sou;

ao meu esposo Victor por todo apoio, incentivo e amor;

aos meus amados filhos, João Pedro e Maria Clara, que me
inspiram a crescer e tentar ser uma pessoa melhor a cada dia.

Muito obrigada.

Agradecimentos

À Prof^a Dr^a Ana Paula, pelo exemplo de caráter, humildade, profissionalismo, comprometimento e dedicação. Minha grande inspiração como médica e ser humano e a quem sou muito grata por toda compreensão, generosidade e pela honra de sua orientação.

Ao Prof. Dr. José Carlos Alves Filho, por disponibilizar seu laboratório e pela excelente e imprescindível colaboração científica para este trabalho.

Aos meus amigos e colaboradores Annie Rocio Piñeros Alvarez, Raphael Gomes Ferreira e Daniele Carvalho Bernardo Nascimento pela dedicação a este trabalho, apoio e inestimável contribuição.

As colegas de turma, Priscila Medeiros, Robertta Marques, Gabriela, Daniela Anderson e Carolina Portugal pelos memoráveis momentos de alegria, amizade e apoio.

À Kátia dos Santos, pelo apoio técnico, disponibilidade e carinho sincero.

À Sra. Vera Lucia de Andrade Hamanaka, pelo generoso auxílio ao longo de todos esses anos.

A todos os colegas pós-graduandos do Departamento de Farmacologia, pelo acolhimento e convivência engrandecedora durante a caminhada.

Aos animais de experimentação utilizados neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

Ao imprescindível apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Aos professores componentes desta banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

À minha família, à qual dedico este trabalho e a Deus por abençoar meus caminhos e me permitir chegar até aqui graças ao apoio de todas essas pessoas maravilhosas que me auxiliaram tão generosamente ao longo de toda essa jornada. Muito obrigada.

“Não nos esqueçamos de que a floresta se levantou de sementes quase invisíveis, de que o rio se forma das fontes pequeninas e de que a luz do Céu, em nós mesmos, começa de pequeninos raios de amor a se nos irradiarem do coração.”

Meimei (Psicografia de Francisco Cândido Xavier)

Resumo

VALE, A. H. F. **Efeito da riboflavina na disfunção orgânica e na mortalidade por sepse grave e choque séptico: estudo experimental.** 2020. 114 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A sepse é a principal causa de mortalidade de pacientes internados em unidade de terapia intensiva e se caracteriza por resposta inflamatória desregulada, estresse oxidativo e alteração mitocondrial, resultando em morte celular e disfunção orgânica. A riboflavina (vitamina B-2) tem efeito antioxidante e anti-inflamatório, além de ser cofator para a fosforilação oxidativa mitocondrial. Estudos experimentais mostraram aumento da sobrevida e redução das concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias em animais com sepse induzida pela injeção de lipopolissacarídeo que receberam tratamento com riboflavina. Os objetivos deste estudo foram avaliar se a administração de riboflavina a animais com sepse induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP) reduz a disfunção orgânica e a mortalidade, comparada com placebo. O estudo foi realizado com camundongos de 6-8 semanas de idade com sepse induzida por CLP, que foram alocados aleatoriamente em três grupos: Controle (bolus de salina EV), Grupo de Estudo (bolus de riboflavina 20 mg/kg EV) e naive (controle não operado), sendo este último utilizado nos experimentos nos quais foram analisados dosagem de citocinas, migração de neutrófilos e quantificação de bactérias, permitindo confirmar o desenvolvimento da sepse após o procedimento cirúrgico ao comparar com os outros dois grupos. Foram avaliados a função renal (creatinina e ureia) e hepática (TGO e TGP), a resposta inflamatória sistêmica (pelas concentrações de interleucina (IL)-6, fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, quimiocina derivada de queratinócitos (KC) e proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2)) e o estresse oxidativo (pelas concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)), 12 horas após o início do experimento. As taxas de sobrevida dos animais foram calculadas após 7 dias. O tratamento com riboflavina, na comparação entre os grupos estudo vs. controle, em ambos os experimentos, não promoveu redução das concentrações séricas de IL-6 (ICr 95% -41,49;15,36 e -0,35;0,44), TNF- α (ICr95% -25,81;52,72 e -15,7;99,05), KC (ICr 95% -1,19;0,38 e -0,13;0,05) e MIP-2 (ICr95% -0,84;0,06). Além disso, não houve diferença significativa nas concentrações no lavado peritoneal, considerando as mesmas citocinas, na comparação entre os grupos estudo vs. controle: IL-6 (ICr 95% -15,62;5,74 e -0,19;0,27), TNF- α (ICr95% -27,44;46,74 e -

79,77;104,9), KC (ICr 95% -0,5;0,25 e -0,2;0,08) e MIP-2 (ICr95% -0,31;0,37). Na comparação entre os grupos submetidos à CLP e o naive, a liberação sistêmica das citocinas mostrou que houve resposta inflamatória após realização do procedimento: KC (-2,19;-0,47 e -1,2;-1,03) e MIP-2 (-1,24;-0,42), grupo estudo vs. naive, e KC (-1,74;-0,12 e -1,16;-0,99) e MIP-2 (-0,91;-0,04) grupo controle vs. naive, mas não foi possível a análise do TNF- α e IL-6 em um dos experimentos, pois o grupo naive foi todo formado por observações iguais a zero. Com relação ao padrão de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, não houve diferença significativa entre os grupos controle vs. estudo (ICr 95% (-0,95;2,7), (-5,98;13,25) e (-0,74;4,26)), nos três experimentos independentes, mas na comparação entre os grupos controle vs. naive (-0,97;-5,04) e estudo vs. naive (-8,2;-3,37) houve diferença significativa em um dos experimentos e nos outros dois não foi possível analisar, pois todas as observações dos grupos naive eram iguais a zero neutrófilos. Consequentemente, o crescimento bacteriano sistêmico (ICr 95% (-0,34;2,87) e (-2,34;0,64)) e peritoneal (ICr 95% (-0,55;4,5), (-3,37;5,61) e (-0,9;0,85)), ao comparar os grupos controle vs. estudo, também não se modificou com o uso da riboflavina nos camundongos sépticos. Os grupos naive de ambos os experimentos não apresentaram crescimento bacteriano sistêmico nem peritoneal, conforme o esperado. Na análise dos marcadores de disfunção orgânica, as concentrações séricas de TGO não apresentaram diferença significativa na comparação entre os grupos controle vs. estudo nos dois experimentos independentes (ICr 95% (-53,3;54,4) e (-10,72;3,98)), e as concentrações de TGP reduziram no grupo tratado com riboflavina no primeiro experimento (ICr 95% (-11,25;-1,98), mas o mesmo não foi observado em um segundo experimento (ICr 95% (-6,57;11,47)). Com relação a CK-MB (ICr 95% (-11,22;62,96) e (-145,1;-30,14)), ureia (ICr 95% (-11,08;63,29) e (-114,74;-15,14)) e creatinina (ICr 95% (-3,22;5,28) e (-1,14;-0,01)), no entanto, ao comparar grupo controle vs. estudo nos dois experimentos, o tratamento com riboflavina não reduziu ou até mesmo promoveu incremento das concentrações nos animais sépticos. Ao avaliar o estresse oxidativo aos lipídeos por meio da quantificação das concentrações de MDA (malondialdeído) não se observou diferença entre os grupos controle vs. estudo: ICr 95% (-1,25;2,53). Também não houve diferença significativa na concentração plasmática de lactato (ICr 95% (-3,21;5,95) e (-16,3;3,97)) na comparação entre os grupos controle vs. estudo, nos dois experimentos realizados. Na análise de sobrevida houve aumento da mortalidade dos animais sépticos que receberam tratamento com riboflavina em comparação com o grupo controle em um dos experimentos (Log-rank $p=0,01$), e não se observou diferença significativa em outro (Log-rank $p=0,8$). Em conclusão, o uso de

riboflavina em camundongos submetidos à sepse induzida por CLP não apresentou efeito em termos de redução da proliferação bacteriana, inflamação local ou sistêmica, peroxidação lipídica e níveis de lactato, e ainda promoveu piora de alguns marcadores de disfunção orgânica e aumento da mortalidade dos animais sépticos.

Palavras-chave: Sepses. Riboflavina. Resposta inflamatória. Disfunção orgânica. Estresse oxidativo.

Abstract

VALE, A. H. F. **Effect of Riboflavin on Organ Dysfunction and Mortality from Severe Sepsis and Septic Shock: an Experimental Study.** 2020. 114 f. (Doctorate) Thesis - Medical School of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Sepsis is the main cause of mortality in patients admitted to the intensive care unit and is characterized by unregulated inflammatory response, oxidative stress and mitochondrial changes, resulting in cell death and organ dysfunction. Riboflavin (vitamin B-2) has an antioxidant and anti-inflammatory effect, in addition to being a cofactor for mitochondrial oxidative phosphorylation. Experimental studies have shown increased survival and reduced plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines in animals with lipopolysaccharide-induced sepsis receiving treatment with riboflavin. The objectives of this study were to assess whether the administration of riboflavin to animals with sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) reduces organ dysfunction and mortality compared to a placebo. This study was conducted with 6-8-week-old mice with CLP-induced sepsis, which were randomly allocated into three groups: Control (IV saline bolus), Study Group (riboflavin bolus 20 mg/kg IV), and Naïve (non-operated control), the latter being used in experiments in which cytokine dosage, neutrophil migration, and bacterial quantification were analyzed, which allowed us to confirm the development of sepsis after the surgical procedure when compared with the other two groups. Kidney (creatinine and urea) and liver (TGO and TGP) function, systemic inflammatory response (by the concentrations of interleukin IL-6), tumor necrosis factor (TNF)-alpha, keratinocyte-derived chemokine (KC), macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2)), and oxidative stress (by the concentrations of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)) were assessed 12 hours after the beginning of the experiment. Animal survival rates were calculated after 7 days. Treatment with riboflavin, comparing the study group vs. control group in both experiments, did not provided any reduction in the IL-6 serum concentrations (95% CrI -41.49;15.36 and -0.35;0.44), TNF- α (95% CrI -25.81;52.72 and -15.7; 99.05), KC (95% CrI -1.19;0.38 and -0.13;0.05) and MIP-2 (95% CrI -0.84;0.06). In addition, there was no significant difference in the concentrations in the peritoneal lavage, considering the same cytokines, when comparing the study group vs. control group: IL-6 (95% CrI -15.62;5.74 and -0.19;0.27), TNF- α (95% CrI -27.44;46.74 and -79.77;104, 9), KC (95% CrI -0.5;0.25 and -0.2;0.08) and MIP-2 (95% CrI -0.31;0.37). When comparing the CLP

and naive groups, the systemic release of cytokines showed an inflammatory response after the procedure, KC (95% CrI -2,19;-0,47 and -1,2;-1,03) e MIP-2 (95% CrI -1,24;-0,42), study group vs. naive, and KC (95% CrI -1,74;-0,12 and -1,16;-0,99) e MIP-2 (95% CrI -0,91;-0,04) control group vs. naive, but it was not possible to analyze TNF- α and IL-6 in one of the experiments, since all observations in the naive group were equal to zero. As to the pattern of neutrophil migration to the peritoneal cavity, there was no significant difference between the control group vs. study group (95% CrI (-0.95;2.7), (-5.98;13.25) and (-0.74;4.26)) in the three independent experiments, but when comparing the control group vs. naive (-0.97;-5.04) and study group vs. naive (95% CrI -8.2;-3.37), there was a significant difference in one of the experiments, but no analysis was possible in the other two groups, since all observations in the naive groups were of zero neutrophils. Consequently, when comparing the control vs. study groups, the systemic bacterial growth (95% CrI (-0.34;2.87) and (-2.34;0.64)) and peritoneal bacterial growth (95% CrI (-0,55;4,5), (-3,37;5,61) and (-0,9;0,85)) also did not change with the use of riboflavin in septic mice. The naive groups for both experiments did not show any systemic or peritoneal bacterial growth as expected. When analyzing the organ dysfunction markers, serum TGO concentrations showed no significant difference between the control group vs. study group in both independent experiments (95% CrI (-53.3;54.4) and (-10.72;3.98)), and TGP concentrations decreased in the riboflavin-treated group in the first experiment (95% CrI (-11.25;-1.98), but this was not seen in a second experiment (95% CrI (-6.57;11.47)). For CK-MB (95% CrI (-11.22;62.96) and (-145.1;-30.14)), urea (95% CrI (-11.08;63.29) and (-114.74;-15.14)) and creatinine (95% CrI (-3.22;5.28) and (-1.14;-0.01)), however, when comparing the control group vs. study group in both experiments, treatment with riboflavin did not reduce nor increase the concentrations in septic animals. When assessing oxidative stress to lipids by quantifying the MDA (malondialdehyde) concentrations, no difference was seen between the control group vs. study group (95% CrI (-1.25;2.53)). There was also no significant difference in the plasma lactate concentration (95% CrI (-3.21;5.95) and (-16.3;3.97)) when comparing the control group vs. study group in both experiments. In the survival analysis, there was an increase in the mortality of septic animals receiving treatment with riboflavin compared to the control group in one of the experiments (Log-rank $p=0.01$), and no significant difference was observed in the other experiment (Log-rank $p=0.8$). In conclusion, the use of riboflavin in mice undergoing CLP-induced sepsis had no effect in terms of reducing bacterial proliferation, local or systemic inflammation, lipid

peroxidation and lactate levels, and further worsened some organ dysfunction markers and increased mortality of septic animals.

Keywords: Sepsis. Riboflavin. Inflammatory response. Organ dysfunction. Oxidative stress.

Lista de figuras

Figura 1. Esquema dos grupos de camundongos, tempo de tratamento e coleta de materiais para análise	51
Figura 2. Fluxograma do estudo e experimentos realizados	55
Figura 3. Representação da quantificação de bactérias no sangue dos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP	58
Figura 4. Representação da quantificação de bactérias no lavado peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP	59
Figura 5. Representação do número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP	61
Figura 6. Representação da concentração sérica da interleucina 6 nos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP	63
Figura 7. Representação da concentração sérica do fator de necrose tumoral α (TNF- α) nos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP	64
Figura 8. Representação da concentração sérica da quimiocina KC nos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP	64
Figura 9. Representação da concentração sérica da quimiocina MIP-2 nos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP	65
Figura 10. Representação da concentração de interleucina 6 no lavado peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP.....	68
Figura 11. Representação da concentração de TNF- α no lavado peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP.....	68
Figura 12. Representação da concentração da quimiocina KC no lavado peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP.....	69
Figura 13. Representação da concentração da quimiocina MIP-2 no lavado peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP.....	69
Figura 14. Representação da concentração sérica de transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) nos camundongos dos grupos controle e tratados com riboflavina.....	72
Figura 15. Representação da concentração sérica de transaminase glutâmico pirúvica (TGP) nos camundongos dos grupos controle e tratados com riboflavina	72
Figura 16. Representação da concentração sérica de CK-MB nos camundongos dos grupos controle e tratados com riboflavina.....	73

Figura 17. Representação da concentração sérica de creatinina nos camundongos dos grupos controle e tratados com riboflavina.....	74
Figura 18. Representação da concentração sérica de ureia nos camundongos dos grupos controle e tratados com riboflavina.....	74
Figura 19. Representação da concentração plasmática de lactato nos camundongos dos grupos controle e tratados com riboflavina.....	76
Figura 20. Representação da concentração de MDA no soro dos camundongos dos grupos controle e tratados com riboflavina.....	77
Figura 21. Representação das curvas de Kaplan-Meier para sobrevida dos camundongos C57BL/6 submetidos à CLP dos grupos controle e riboflavina.....	78

Lista de tabelas

Tabela 1-	Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo da quantificação de bactérias no sangue (Log_{10} UFC/mL) dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).....	57
Tabela 2-	Comparação da quantificação de bactérias no sangue (Log_{10} UFC/mL) dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).....	57
Tabela 3-	Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo da quantificação de bactérias no lavado peritoneal (Log_{10} UFC/mL) dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).....	58
Tabela 4-	Comparação da quantificação de bactérias no lavado peritoneal (Log_{10} UFC/mL) dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).....	59
Tabela 5-	Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo da quantificação de neutrófilos (número neutrófilos $\times 10^6$) na cavidade peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2)	60
Tabela 6-	Comparação da quantificação de neutrófilos (número neutrófilos $\times 10^6$) na cavidade peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT entre os grupos naïve (G1), controle (G2) e tratados com riboflavina (G3), 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	60
Tabela 7-	Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo das concentrações séricas de interleucinas IL-6 (ng/mL) e TNF- α (pg/mL), e quimiocinas KC (ng/mL) e MIP-2 (ng/mL) nos camundongos C57BL/6 WT dos grupos naïve (G1), controle (G2) e riboflavina (G3), 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	61
Tabela 8-	Comparação das concentrações séricas de interleucinas IL-6 (ng/mL) e TNF- α (pg/mL), e quimiocinas KC (ng/mL) e MIP-2 (ng/mL) nos camundongos C57BL/6 WT entre os grupos naïve (G1), controle (G2) e riboflavina (G3), 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP).	62
Tabela 9-	Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo das concentrações no lavado peritoneal de interleucinas IL-6 (ng/mL) e TNF- α (pg/mL), e quimiocinas KC (ng/mL) e MIP-2 (ng/mL) nos camundongos C57BL/6 WT dos grupos naïve (G1), controle (G2) e riboflavina (G3), 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	66

Tabela 10- Comparação das concentrações no lavado peritoneal de interleucinas IL-6 (ng/mL) e TNF- α (pg/mL), e quimiocinas KC (ng/mL) e MIP-2 (ng/mL) nos camundongos C57BL/6 WT entre os grupos naïve (G1), controle (G2) e riboflavina (G3), 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP).	67
Tabela 11- Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo das concentrações séricas dos marcadores de disfunção orgânica TGO (U/mL), TGP (U/mL), CK-MB (U/L), creatinina (mg/dL) e ureia (mg/dL) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).....	70
Tabela 12- Comparação das concentrações séricas dos marcadores de disfunção orgânica TGO (U/mL), TGP (U/mL), CK-MB (U/L), creatinina (mg/dL) e ureia (mg/dL) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).....	71
Tabela 13- Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo da concentração plasmática de lactato (mg/dL) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2)	75
Tabela 14- Comparação das concentrações plasmáticas de lactato (mg/dL) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2)	75
Tabela 15- Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo dos níveis de MDA no soro (mmol/L) dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).....	77
Tabela 16- Comparação dos níveis de MDA (mmol/L) no soro dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).	77

Lista de abreviaturas e siglas

ATP	Adenosina trifosfato
APCs	Células apresentadoras de antígenos
°C	Graus Celsius
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CK-MB	Creatine quinase-MB
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CXCR1	Receptor de quimiocina CXCL1
CXCR2	Receptor de quimiocina CXCL2
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenoaminotetracético
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
G	<i>Gauge</i>
g	Grama
H	Hidrogênio
ICr	Intervalo de credibilidade
IL	Interleucina
iNO	Isoforma indutível da oxido nítrico sintase
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos (<i>Keratinocyte-derived chemokine</i>)
Kg	Kilograma
L	Litro
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
Mg	Miligrama
MIP-2	<i>Macrophage-inflammatory protein-2</i>
mL	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
MPO	Mieloperoxidase
mmol	Milimol
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADH	NAD no estado reduzido
NE	Elastase neutrofílica
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico

PAM	Pressão arterial média
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
PELOD	<i>Pediatric Logistic Organ Dysfunction</i>
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
q-SOFA	<i>Quick -Sequential Organ Failure Assessment</i>
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas derivadas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive substances</i>
WT	<i>Wild Type</i>
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TRL	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	Considerações gerais sobre sepse	25
2.2	Modelos experimentais de sepse	28
2.3	Resposta imune durante a sepse	30
2.4	Papel dos neutrófilos na sepse	32
2.5	Disfunção de órgãos na sepse	34
2.6	Estresse oxidativo durante a sepse	38
2.7	Lactato	40
2.8	Considerações gerais sobre a Riboflavina	42
3	JUSTIFICATIVA	45
4	HIPÓTESE	46
5	OBJETIVOS.....	47
6	MATERIAIS E MÉTODOS	48
6.1	Animais Experimentais	48
6.2	Protocolos experimentais	48
6.2.1	Modelo de sepse polimicrobiana	48
6.2.2	Grupos de camundongos, tratamento com riboflavina e coleta de sangue e lavado peritoneal para análise	49
6.3	Preparo de Soluções.....	51
6.4	Determinação de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal	52
6.5	Quantificação de bactérias no sangue e lavado peritoneal	52
6.6	Quantificação de citocinas.....	53
6.7	Dosagem de lactato.....	53
6.8	Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	53
6.9	Determinação da concentração de malondialdeído (MDA)	54
6.10	Determinação da taxa de sobrevivência de camundongos submetidos a sepse e tratados com antibioticoterapia ou antibioticoterapia e riboflavina	54
6.11	Análise estatística	56
7	RESULTADOS	57

7.1	Quantificação de bactérias no sangue.....	57
7.2	Quantificação de bactérias no lavado peritoneal	58
7.3	Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal	59
7.4	Avaliação da liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.....	61
7.5	Avaliação da liberação peritoneal de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas	65
7.6	Avaliação dos marcadores de disfunção orgânica	70
7.7	Avaliação das concentrações plasmáticas de lactato	75
7.8	Avaliação do estresse oxidativo	76
7.9	Avaliação da sobrevida	78
8	DISCUSSÃO	79
9	CONCLUSÃO	90
10	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Com base na publicação da *International Pediatric Sepsis Consensus Conference* (IPSCC), em pediatria a sepse é definida como infecção suspeita ou confirmada na presença de pelo menos dois ou mais critérios da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e a sepse grave como a presença de sepse associada à disfunção cardiovascular ou a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) ou a duas ou mais das demais disfunções orgânicas (renal, hematológica, neurológica, hepática) (GOLDSTEIN et al., 2005). Recentemente, foi publicado o Terceiro Consenso Internacional para Sepse e Choque Séptico, no qual a sepse, em adultos, passou a ser definida como “disfunção orgânica com risco de vida, causada pela resposta desregulada do hospedeiro à infecção” (SINGER et al., 2016). O termo “sepse grave” foi substituído por esta nova definição de sepse, e embora tenha sido tentada a aplicação de Sepsis-3 em crianças (MATICS; SANCHEZ-PINTO, 2017; SCHLAPBACH et al., 2018), ainda estão pendentes revisões formais das definições de sepse pediátrica de 2005 (SCHLAPBACH; KISSOON, 2018).

A sepse é considerada um problema mundial de saúde, com incidência crescente, altas taxas de mortalidade e custos significativos de tratamento nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (IWASHYNA et al., 2012; LAGU et al., 2012; GAIESKI et al., 2013; STOLLER et al., 2016; NEIRA; HAMACHER; JAPIASSU, 2018; LIU et al., 2019). Embora estudos de diferentes países ao redor do mundo tenham demonstrado uma diminuição na taxa de mortalidade por sepse nos últimos anos (ZIMMERMAN; KRAMER; KNAUS, 2013; KAUKONEN et al., 2014), o número absoluto de pacientes que morrem por sepse está aumentando em virtude do aumento de sua incidência (DE LA RICA; GILSANZ; MASEDA, 2016; SHEN et al., 2017). A resolução sobre sepse realizada pela Assembleia Mundial da Saúde das Nações Unidas em maio de 2017 reconhece a sepse como uma ameaça global em adultos e crianças e uma prioridade para a Organização Mundial da Saúde abordar durante a próxima década (REINHART et al., 2017). Esta resolução reconhece que a sepse representa um dos principais contribuintes para a morbidade e mortalidade na infância, além do ônus econômico associado (SCHLAPBACH; KISSOON, 2018).

Os custos hospitalares com sepse nos EUA é o mais alto entre as admissões para todos os estados de doença, refletindo, em 2013, US \$ 23,7 bilhões em despesas, 6,2% do total de custos hospitalares, apesar de representar apenas 3,6% das internações (TORIO; MOORE,

2016). Embora a verdadeira incidência seja desconhecida, estimativas conservadoras indicam que a sepse seja uma das principais causas de mortalidade e doença crítica em todo o mundo (VINCENT et al., 2014; FLEISCHMANN et al., 2016).

Nos últimos anos, um conjunto significativo de estudos tem sido publicado na tentativa de compreender os complexos mecanismos fisiopatológicos dinâmicos subjacentes da síndrome séptica. A resposta específica em qualquer doente depende do agente patogênico causador (carga e virulência) e as características genéticas do hospedeiro e doenças coexistentes, com respostas diferenciadas em níveis locais, regionais e sistêmicos (ANGUS; VAN DER POLL, 2013). Apesar da crescente compreensão desse complexo processo de doença, a sepse continua sendo a causa mais comum de morte na unidade de terapia intensiva não coronariana (BULLOCK; BENHAM, 2020).

Estudos pré-clínicos em animais são obrigatórios antes que novos tratamentos possam ser testados em ensaios clínicos. No entanto, seu uso no desenvolvimento de novas terapias para sepse tem sido controverso em razão das limitações dos modelos e inconsistências com as condições clínicas (ZINGARELLI et al., 2019). Neste contexto, o modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP) começa com uma flora intestinal, que pode ou não estar em condição disbiótica (LANKELMA et al., 2017), e induz a sepse secundária à peritonite, seguida por translocação polimicrobiana na circulação sanguínea, uma fase inflamatória e a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos, sendo, portanto, capaz de representar parcialmente a progressão de fenômenos fisiopatológicos semelhantes aos que ocorrem em seres humanos, como as alterações que ocorrem no estágio inicial da inflamação, e exibir cinética de citocinas comparáveis às da sepse clínica (DEJAGER et al., 2011; DENG et al., 2017; LI et al., 2018). Apesar de apresentar limitações, nas diretrizes para estudos pré-clínicos de sepse, o modelo de CLP é visto favoravelmente (LIBERT et al., 2019).

A patogênese da disfunção orgânica que ocorre na sepse não é totalmente compreendida e continua sendo uma área ativa de investigação científica (GUSTOT, 2011; CECCONI et al., 2018). Entretanto, há evidências crescentes de que os mediadores inflamatórios atuam sinergicamente com os produtos finais do microrganismo para induzir ativação sistêmica de neutrófilos, que se acumulam na microcirculação, induzindo citotoxicidade local mediada por radicais livres e/ou enzimas citotóxicas derivados do oxigênio e/ou nitrogênio (HOTCHKISS; KARL, 2003; HOESEL et al., 2005).

Atualmente não existe tratamento específico para a sepse (BHAN et al., 2016). A riboflavina (vitamina B-2) é uma vitamina essencial, solúvel em água e presente numa grande

variedade de alimentos. Pode atuar como antioxidante contra o estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e, especialmente, na lesão oxidativa de reperfusão (CHOUCHANI et al., 2014). Em vários modelos experimentais relacionados à lesão por isquemia-reperfusão, a administração de riboflavina resultou em diminuição da agressão tecidual em consequência do estresse oxidativo (BETZ et al., 1994; SEEKAMP; HULTQUIST; TILL, 1999; SANCHES et al., 2014). Adicionalmente, alguns estudos demonstraram atividade anti-inflamatória da riboflavina em modelos experimentais de inflamação local e sistêmica (TOYOSAWA et al., 2004a, 2004b; KODAMA et al., 2005).

Como têm sido relatados benefícios anti-inflamatórios e antioxidantes da riboflavina, que é uma vitamina relativamente barata e não tóxica, o objetivo deste estudo foi avaliar possíveis benefícios desta vitamina sobre o estresse oxidativo, a disfunção de órgãos, a resposta inflamatória e a mortalidade, em modelo experimental de sepse polimicrobiana induzida pela CLP em camundongos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre sepse

A palavra sepse é derivada do grego *sêpsis* e significa “putrefação” ou “tornar pútrido”. O termo sepse foi usado pela primeira vez há mais de 2700 anos por Homer. Também foi encontrado nos escritos de Hipócrates (400 a. C.), que descrevia a doença como um comprometimento biológico, perigoso e odorífero que ocorria no organismo. Somente há pouco mais de um século foi feita a associação entre a presença de bactérias no organismo e os sinais de doença sistêmica. Com isso, sepse tornou-se sinônimo de infecção grave (SILVA et al., 2008; FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009; VINCENT; MARTINEZ; SILVA, 2009)

Na conferência de 2016 entre a *Society of Critical Care Medicine* e a *European Society of Intensive Care Medicine* foram estabelecidas novas definições de sepse em adultos, enfatizando a primazia da resposta do hospedeiro não homeostática à infecção, a letalidade potencial que excede consideravelmente uma simples infecção, e a necessidade de reconhecimento urgente (SINGER et al., 2016). Anteriormente, considerava-se como requisito para sepse a presença de dois ou mais dos quatro critérios de SIRS (Síndrome da resposta inflamatória sistêmica), mas foi retirado na atual definição do SEPSE-3, pois febre, taquicardia, taquipneia e alterações na contagem de leucócitos refletem inflamação, a resposta do hospedeiro ao "perigo" na forma de infecção ou outros insultos, estando presente em muitos pacientes hospitalizados, incluindo aqueles sem infecção (SINGER et al., 2016; HOTCHKISS et al., 2016). Contudo, apesar de a força-tarefa ter reconhecido “a necessidade de desenvolver definições semelhantes e atualizadas para populações pediátricas” (SCHLAPBACH et al, 2017), as definições vigentes permanecem essencialmente baseadas na Sepse-2 (SCHLAPBACH et al., 2018). A tradução dos critérios do Sepse-3 para pediatria vai exigir que sejam levadas em consideração as diferenças relacionadas à idade na fisiopatologia e nas manifestações clínicas (SCHLAPBACH; KISSOON, 2018).

O diagnóstico clínico de choque séptico é feito em crianças que têm suspeita de infecção manifestada por hipotermia ou hipertermia e apresentam sinais clínicos de perfusão tecidual inadequada (DAVIS et al., 2017). Já em adultos, o choque séptico atualmente é definido como uma subcategoria da sepse associada a anormalidades circulatórias, metabólicas e celulares profundas, sendo identificado clinicamente pela presença da sepse associada à hipotensão persistente que requer uso de vasopressores para manter a PAM $\geq$ 65 mmHg e nível sérico de lactato > 2 mmol/L (18mg/dL), a despeito da ressuscitação volêmica

adequada, resultando em mortalidade hospitalar superior a 40% (SINGER et al., 2016; SHANKAR-HARI et al., 2016). Uma complicação frequente da sepse é o desenvolvimento da disfunção orgânica, definida como aumento sequencial na falha de órgãos, associado com infecção e mortalidade maior que 10%. Assim, considerando o potencial de letalidade referido nas atuais definições, o termo “sepse grave” se tornou supérfluo (SINGER et al., 2016).

Globalmente, estima-se 22 casos de sepse na infância por 100.000 pessoas-ano e 2.202 casos de sepse neonatal por 100.000 nascidos vivos e, extrapolando esses números em escala global, estima-se uma incidência de 3 milhões de casos de sepse em neonatos e 1,2 milhões de casos em crianças por ano (FLEISCHMANN-STRUZEK et al., 2018). Mais de 4% de todos os pacientes hospitalizados com menos de 18 anos e em torno de 8% dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva pediátrica nos países de alta renda têm sepse (BALAMUTH et al., 2014; RUTH et al., 2014; WEISS et al., 2015; SCHLAPBACH et al., 2015; WEISS et al., 2020). A mortalidade de crianças com sepse varia de 4% a 50%, dependendo da gravidade da doença, fatores de risco e localização geográfica (BALAMUTH et al., 2014; AMES et al., 2018; EVANS et al., 2018; PROUT et al., 2018). A maioria das crianças que morrem de sepse sofre de choque refratário e / ou síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, com muitas mortes ocorrendo nas primeiras 48 a 72 horas de tratamento (CVETKOVIC et al., 2015; MORIN et al., 2016; SCHLAPBACH et al., 2017; WEISS et al., 2017)

A sepse afeta aproximadamente 1,7 milhão de adultos nos Estados Unidos a cada ano e potencialmente contribui para mais de 250.000 mortes (RHEE et al., 2017). Vários estudos estimam que a sepse esteja presente em 30% a 50% das hospitalizações que culminam com a morte (LIU et al., 2014; RHEE et al., 2017; RHEE et al., 2019). Tem sido relatado aumento progressivo na incidência de sepse e choque séptico em países desenvolvidos nas últimas décadas; por exemplo, durante 2004-2009, a incidência de sepse aumentou de 300 para 1031 casos por 100.000 habitantes nos EUA (KEMPKER; MARTIN, 2016; LUHR et al., 2019). No entanto, foi realizada uma meta-análise usando dados de ensaios clínicos randomizados sobre sepse publicados entre 2002 e 2016 que não identificou alteração significativa na mortalidade ao longo do tempo (LUHR et al., 2019).

No Brasil, de 2006 a 2015, a taxa de letalidade global variou entre 46,3% e 64,5%, e a incidência anual de sepse aumentou 50,5%, provavelmente refletindo uma população em envelhecimento com mais comorbidades e iniciativas como o *Surviving Sepsis Campaign* (ILAS, 2017), melhorando a conscientização dos profissionais de saúde sobre o diagnóstico correto de sepse (DELLINGER, 2013; NEIRA; HAMACHER; JAPIASSU, 2018). No

entanto, o número de casos de sepse no país é desconhecido (ILAS, 2017; FLEISCHMANN et al., 2016).

Apesar da mortalidade elevada, faltam dados epidemiológicos abrangentes sobre a carga global de sepse (HOTCHKISS et al., 2016). Uma tentativa de extrapolação de dados de países de alta renda sugere que 31,5 milhões de casos de sepse ocorram globalmente a cada ano, com potencialmente 5,3 milhões de mortes por ano. Esses números são simplesmente estimativas, porque o conhecimento sobre a incidência e a mortalidade da sepse em países de baixa e média renda continua escasso, e o número de casos de sepse no país é desconhecido (JAWAD; LUKSIC; RAFNSSON, 2012; FLEISCHMANN et al., 2016). Dados epidemiológicos mostraram uma taxa de mortalidade em declínio na sepse. No entanto, efeitos de confusão em virtude de diferenças na classificação, aumento da conscientização da doença e codificação incorreta relacionada a dados obtidos retrospectivamente podem ter contribuído para essas tendências (ANGUS; VAN DER POLL, 2013; LUHR et al., 2019).

Os custos hospitalares da sepse nos Estados Unidos são atualmente mais do que o dobro do custo do tratamento de outras condições e continuam a crescer três vezes a taxa de outras admissões (PAOLI et al., 2018), mas estes gastos variam de acordo com cada país influenciados por fatores como idade, gravidade da sepse e tipo de instituição (NEIRA; HAMACHER; JAPIASSU, 2018). Além disso, há uma crescente conscientização de que os pacientes que sobrevivem à sepse muitas vezes apresentam incapacidades físicas, psicológicas e cognitivas em longo prazo, com necessidade significativa de cuidados de saúde e implicações sociais (IWASHYNA et al., 2012). Assim, o tratamento da sepse impõe uma pesada carga econômica nos sistemas de saúde no mundo todo (CHALUPKA; TALMOR, 2012).

Pesquisas revelam que a fisiopatologia da progressão da sepse é muito mais complexa do que apenas a inflamação ou o reconhecimento de padrões microbianos ou do hospedeiro, pois envolve efeitos em tecidos endoteliais e microcirculação, imunidade primária e secundária, coagulação, tecidos parenquimatosos e distúrbios neurológicos que afetam diretamente as células e os neurônios da micróglia (LEVI; SCHULTZ; VAN DER POLL, 2013; WHITE et al., 2013; DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014; OPAL; VAN DER POLL, 2015). Desse modo, apesar do aumento dramático do conhecimento sobre a sepse, suas origens, progressão e resolução (recuperação ou morte), a capacidade de intervir e de alterar a trajetória da doença tem sido apenas parcialmente bem-sucedida (HOTCHKISS et al., 2016).

A sepse é um desafio para os cientistas e para o mundo moderno, não existindo atualmente um tratamento específico (BHAN et al., 2016). Os resultados do uso de agentes imunomoduladores, até o momento, têm sido desapontadores e nenhum biomarcador pode definitivamente diagnosticar a sepse ou prever seu desfecho clínico (HOTCHKISS et al., 2016). A melhora dos resultados na sepse é mais comumente atribuída ao reconhecimento precoce e melhor adesão às terapias de suporte, como ressuscitação hídrica, administração rápida de antibióticos eficazes, bem como melhorias no tratamento de pacientes gravemente enfermos, como ventilação pulmonar protetora, uso criterioso de hemoderivados e estratégias para reduzir infecções nosocomiais (LEVY et al., 2015; GOTTS; MATTHAY, 2016).

2.2 Modelos experimentais de sepse

Estudos pré-clínicos em animais são obrigatórios antes que novos tratamentos possam ser testados em ensaios clínicos (ZINGARELLI et al., 2019). Entretanto, quando comparado com outros estados inflamatórios, a complexidade da sepse tem dificultado o desenvolvimento de modelos animais fidedignos (OSUCHOWSKI et al., 2018), o que, somado à falta de padronização, limita a pesquisa com animais, reduzindo as oportunidades de identificar e testar novas terapias (OSUCHOWSKI; THIEMERMANN; REMICK, 2017; REMICK et al., 2019). Por exemplo, é inadequado fazer comparações entre a natureza complexa da condição humana e um modelo homogêneo de endotoxemia em única linhagem genética de camundongo (OSUCHOWSKI et al., 2014; TAKAO; MIYAKAWA, 2015). Além disso, experimentos de pré-tratamento para sepse se traduzem mal em pacientes humanos, que não têm a oportunidade da terapia clínica antes de desenvolver uma infecção com risco de vida (DEITCH et al., 1998; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016).

Dentre os vários modelos experimentais de sepse murina, os mais comumente usados incluem o modelo de endotoxemia, que consiste na injeção de lipopolissacarídeo purificado (LPS), geralmente intraperitoneal, injeção bacteriana intraperitoneal ou intravenosa e a indução de peritonite polimicrobiana, por meio de ligação e punção do ceco (CLP) (LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016; GONG; WEN, 2019). O modelo de endotoxemia, embora simples de aprender e conveniente de executar, possui limitações inerentes, pois é essencialmente um modelo de intoxicação, e não um verdadeiro estado séptico; não há fonte microbiana para a liberação contínua de LPS, e o lipopolissacarídeo é um componente único dos padrões moleculares associados a patógenos complexos (PAMPs) liberados por organismos gram-negativos, negligenciando as interações hospedeiro-patógeno de organismos

Gram-positivos e sepse polimicrobiana (LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). Quando comparada à sepse humana, a endotoxemia resulta em altas concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias, que atingem um pico mais cedo e valores maiores e demonstram uma resolução mais rápida (RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007; CHEN; STANOJCIC; JESCHKE, 2014; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). Para a injeção bacteriana, intraperitoneal ou intravenosa, utiliza-se comumente *Escherichia coli* ou *Staphylococcus* sp. para induzir a sepse por Gram-negativo e Gram-positivo, respectivamente. Porém, são necessários inóculos grandes, pela incapacidade da maioria das cepas de se multiplicar in vivo, e as respostas de citocinas observadas são semelhantes aos modelos de injeção de LPS (DEITCH et al., 1998; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). Além disso, a magnitude da resposta do hospedeiro observada nesses modelos depende da via de administração das bactérias (CHEN; STANOJCIC; JESCHKE, 2014), e não imita a condição séptica humana, pois não há um fluxo constante de bactérias (POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008).

O modelo CLP tem sido amplamente utilizado há vários anos para estudar a fisiopatologia da sepse (DEJAGER et al., 2011) e testar diferentes terapias para melhorar a sobrevida (REMICK et al., 2019). Em comparação com outros modelos, fornece melhor representação da complexidade da sepse humana e envolve a combinação de três insultos: trauma tecidual devido à laparotomia, necrose causada por ligadura do ceco e infecção causada pelo vazamento da flora microbiana no peritônio (LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). A CLP satisfaz muitos dos critérios essenciais de um bom modelo de sepse: um procedimento simples, natureza polimicrobiana com foco infeccioso localizado e produtos bacterianos liberados na periferia que levam à septicemia (DEJAGER et al., 2011). O insulto infeccioso resultante da realização do procedimento CLP pode ser modulado e as fontes de variabilidade incluem, mas não se limitam ao comprimento das lesões associadas, o tamanho e o número de punções criadas, a quantidade de fezes extravasada da cecotomia, o uso de antibióticos e, em caso afirmativo, qual medicamento e regime, o tempo e o volume de ressuscitação de fluidos após a CLP, a habilidade cirúrgica individual de cada operador em relação ao tempo de operação e a quantidade de trauma tecidual (HUBBARD et al., 2005). Além disso, os focos de infecção são facilmente envolvidos pelo omento e pelo tecido circundante (SONG; ZOU; CAO, 2018). Consequentemente, todos esses fatores afetam o prognóstico dos camundongos e pode levar a diferentes interpretações dos resultados (RUIZ et al., 2016; SONG; ZOU; CAO, 2018).

Em consideração à definição revisada para sepse clínica e choque séptico (Sepsis-3), uma Conferência Wiggers-Bernard foi realizada em Viena, em maio de 2017, para propor diretrizes padronizadas sobre modelagem pré-clínica de sepse (OSUCHOWSKI et al., 2018; ZINGARELLI et al., 2019). Dentre as diversas recomendações, as intervenções terapêuticas devem ser iniciadas após o insulto séptico, mimetizando os cuidados clínicos, com tratamento randomizado e cego, quando viável, e o seguimento da sobrevida deve refletir razoavelmente o curso clínico temporal do modelo de sepse. Além disso, com relação aos tipos de infecção, o desafio com LPS não foi considerado um modelo apropriado para indução da sepse e os micro-organismos usados em modelos animais devem reproduzir preferencialmente aqueles comumente encontrados na sepse humana, enquanto que os antimicrobianos devem ser escolhidos com base no modelo e no patógeno provável/conhecido, com administração que simula a prática clínica e início após o estabelecimento da sepse (OSUCHOWSKI et al., 2018). Deste modo, comparado com uma injeção de lipopolissacarídeo ou de bactérias vivas, o modelo de perfuração e ligadura cecal apresenta características de melhor relevância clínica e menor custo (SONG; ZOU; CAO, 2018). Embora não reflitam inteiramente a complexidade clínica, os modelos animais continuam sendo uma abordagem valiosa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (RUIZ et al., 2016).

2.3 Resposta imune durante a sepse

A sepse é reconhecida por envolver a ativação precoce de respostas pró e anti-inflamatórias (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013), cuja magnitude depende do patógeno causador, incluindo carga microbiana e virulência, local da infecção, tempo decorrido desde o início da infecção e fatores do hospedeiro, cuja heterogeneidade clínica e biológica, como composição genética, sexo, idade, raça, comorbidades, medicamentos, lesões concomitantes (incluindo cirurgia), acrescentam ainda mais complexidade à síndrome (ISKANDER et al., 2013; KWAN et al., 2013; WIERSINGA et al., 2014; SINGER et al., 2016). Adicionalmente, também ocorrem grandes modificações nas vias não imunológicas, como cardiovascular, neuronal, autonômica, hormonal, bioenergética, metabólica e de coagulação, todos com significado prognóstico (SINGER et al., 2004; ANGUS; VAN DER POLL, 2013; DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014). Pode ser originada por infecções por fungos, bactérias ou vírus, sendo a infecção bacteriana a causa mais comum (VINCENT et al., 2013). Em crianças a sepse é mais comumente causada por bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas, embora a prevalência relativa desses patógenos varie de acordo com a idade,

região geográfica, localização do início da sepse (comunidade x nosocomial) e outros fatores do paciente (WEISS et al., 2020).

A invasão por um patógeno causa uma resposta imediata do organismo atacado via imunidade inata (STIEL; MEZIANI; HELMS, 2018). Esse reconhecimento do microrganismo invasor ocorre por meio de estruturas expressas em sua superfície, denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), em particular lipopolissacarídeos (LPS), bem como padrões moleculares associados a danos (DAMPs), sinais endógenos expressos após contato com o patógeno (moléculas liberadas de células hospedeiras danificadas, incluindo ATP, DNA mitocondrial, entre outras) (TANG et al., 2013; GOTTS; MATTHAY, 2016). Os PAMPs e DAMPs são reconhecidos por receptores transmembrana específicos, os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, *pattern recognition receptors*), incluindo TLRs (Toll-like receptors), expressos na superfície de células imunes, como macrófagos, células apresentadoras de antígenos (APCs) ou linfócitos, levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e recrutamento de leucócitos no local da inflamação (KUMAR; BOT, 2013; JIN et al., 2019).

A ativação simultânea de vários TLRs é necessária para a reprogramação de células imunes ao fenótipo pró-inflamatório (TING TAN et al., 2013). Assim, é iniciada a transcrição de vários genes, entre eles os de citocinas associadas à inflamação, incluindo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), Interleucina 1 (IL-1), IL-12, IL-18 e Interferons do tipo 1 (IFNs). Esses mediadores levam a produção e liberação de outras citocinas pró-inflamatórias (interferon β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1, etc.) e quimiocinas, uma família de pequenas citocinas, que recrutam outras células circulantes, notadamente os neutrófilos, que posteriormente migram por quimiotaxia (LUSTER, 1998; SÔNEGO et al., 2016; HOTCHKISS et al., 2016; STIEL; MEZIANI; HELMS, 2018). IL-6 e TNF- α contribuem para a gravidade da sepse, sendo importantes indicadores de gravidade e prognóstico (VOSS et al., 2016; PRAUCHNER, 2017; SONG; ZOU; CAO, 2018).

A resposta inflamatória das citocinas atinge o controle rápido de infecções menores e localizadas. No entanto, quando a resposta excede certo limiar, ocorre lesão sistêmica (GOTTS; MATTHAY, 2016). Logo, de maneira geral, podemos dizer que a sepse produz duas respostas inflamatórias: uma local, que tem a função de controlar o microrganismo, e outra sistêmica, que é consequência da exacerbação da resposta inflamatória local e responsável pela maioria das alterações fisiopatológicas da sepse, como as lesões teciduais e

disfunções de órgãos, observadas tanto em pacientes como em modelos experimentais de sepse (DINARELLO, 1997; STEARNS-KUROSAWA et al., 2011).

2.4 Papel dos neutrófilos na sepse

Os neutrófilos são leucócitos altamente diferenciados que se formam e amadurecem na medula óssea antes de serem liberados na corrente sanguínea (SÔNEGO et al., 2016; STIEL; MEZIANI; HELMS, 2018). Essas células estão associadas à resposta imune inata, sendo recrutadas para o local da infecção em resposta aos mediadores quimiotáticos, onde desempenham papéis antimicrobianos (MANTOVANI et al., 2011; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). A presença de neutrófilos no local da infecção é essencial para o controle da carga bacteriana e fúngica e evitar a disseminação sistêmica da infecção (ERMERT; ZYCHLINSKY; URBAN, 2009; LEE et al., 2017). Estudos experimentais e clínicos demonstraram que a deficiência destes leucócitos aumenta a susceptibilidade a infecções fúngicas e bacterianas (BROWN et al., 2006; BOUMA et al., 2010; NESHER; ROLSTON, 2014; SWAMYDAS et al., 2016).

A atividade antimicrobiana dos neutrófilos inclui o reconhecimento de patógenos invasores e componentes microbianos por meio de receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) ou padrões moleculares associados a danos (DAMP), levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e ao recrutamento de leucócitos no local da infecção (SÔNEGO et al., 2016; SHEN et al., 2017; JIN et al., 2019). Uma vez que os neutrófilos alcançam o foco da infecção durante a sepse, eles eliminam microrganismos por fagocitose e produção de substâncias antimicrobianas, como enzimas proteolíticas, ROS e espécies reativas de nitrogênio que degradam os patógenos internalizados (NAUSEEF; BORREGAARD, 2014; BHAN et al., 2016; SPILLER et al., 2019). Também são capazes de liberar o conteúdo de seus núcleos na forma de uma malha de fragmentos de DNA e nucleossomas modificados, que suportam enzimas como mieloperoxidase (MPO) e elastase neutrofílica (NE). Estas estruturas, chamadas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), fagocitam e matam microorganismos invasores para evitar sua disseminação, apresentando função antimicrobiana e antifúngica (BRINKMANN et al., 2004; URBAN et al., 2006; SÔNEGO et al., 2016; STIEL; MEZIANI; HELMS, 2018). Todas essas funções efectoras dos neutrófilos são influenciadas pela sepse (SHEN et al., 2017).

A migração de neutrófilos para o local da infecção é fundamental para o controle do patógeno (BHAN et al., 2016), e as quimiocinas são uma família de pequenas citocinas que

desempenham um papel importante no recrutamento destas células (SÔNEGO et al., 2016). Em condições fisiológicas, os neutrófilos expressam os receptores CXCR1 e CXCR2, dois receptores para IL-8 que não existem em roedores (STIEL; MEZIANI; HELMS, 2018). Dados de estudos anteriores sugerem que durante a sepse letal experimental, há falha na migração de neutrófilos para o foco da infecção, que está correlacionada a depuração bacteriana deficiente e alta taxa de mortalidade (BENJAMIM et al., 2002; ALVES-FILHO et al., 2006; SPILLER et al., 2019). Por exemplo, neutrófilos isolados de pacientes sépticos mostram redução na expressão de CXCR2 e diminuição da quimiotaxia em IL-8, comparado com neutrófilos isolados de indivíduos saudáveis (LERMAN; KIM, 2015; BHAN et al., 2016). Uma explicação é que concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias circulantes no início da sepse aumentam os níveis de óxido nítrico induzido (NOi) (RAYMOND et al., 2018) que, por sua vez, prejudica a migração de neutrófilos para o foco de infecção por diversos mecanismos, incluindo redução da adesão, rolagem e quimiotaxia, diminuindo a expressão de selectinas e receptores quimiotáticos (ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010; ZHANG et al., 2016; SPILLER et al., 2019).

Entretanto, além do papel protetor, os neutrófilos podem ser prejudiciais e induzir danos secundários aos órgãos durante a sepse. Demonstrou-se que a resposta inflamatória sistêmica leva à ativação de neutrófilos circulantes sequestrados em leitos capilares, ocluindo o lúmen e induzindo isquemia tecidual (BROWN et al., 2006). Adicionalmente, a sepse pode induzir uma “desregulação” da migração de neutrófilos que se acumulam em órgãos vitais, como pulmão, rim e fígado (RIOS-SANTOS et al., 2007). Este fenômeno resulta em redução da capacidade do hospedeiro controlar a infecção e aumenta o dano tecidual, com o desenvolvimento de disfunção orgânica (SOUTO et al., 2011; CÓLON et al., 2019). Além disso, citocinas e mediadores pró-inflamatórios secretados por neutrófilos alteram o perfil de membrana das células vasculares, em particular das células endoteliais, contribuindo para disfunção celular e coagulopatia séptica (BROWN et al., 2006, FANG et al., 2015). Evidências mostraram que as redes extracelulares de neutrófilos (NETs), liberadas para degradar fatores de virulência e matar bactérias, também foram implicadas na patogênese da disfunção orgânica (KHANDPUR et al., 2013; WONG et al., 2015; MERZA et al., 2015; CÓLON et al., 2019). Recentemente, também foi demonstrado que pacientes pediátricos com sepse exibem concentrações mais elevadas de NETs plasmáticas do que pacientes adultos e seus níveis se correlacionam diretamente com a gravidade da doença (CÓLON et al., 2019). Mais estudos são necessários para a compreensão dos fatores envolvidos no dano tecidual,

objetivando o desenvolvimento de tratamentos que durante a sepse auxiliem no aumento das taxas de sobrevivência.

2.5 Disfunção de órgãos na sepse

O desenvolvimento da disfunção orgânica é o evento clínico mais importante durante a sepse, uma vez que está diretamente relacionado à mortalidade e morbidade, pois mesmo em grau leve, quando se suspeita de infecção, está associado à mortalidade intra-hospitalar superior a 10% (SINGER et al., 2016). Embora a nova definição Sepsis-3 capte esse conceito, centralizando a essência clínica da sepse no desenvolvimento de "disfunção orgânica fatal causada por resposta desregulada do hospedeiro à infecção" (SINGER et al., 2016), a compreensão dos mecanismos pelos quais a sepse induz disfunção orgânica permanece incompleta, e essa lacuna de conhecimento não é trivial, pois a mortalidade continua muito alta e as opções terapêuticas são limitadas e inespecíficas (POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018).

Seis tipos de disfunção de órgãos predominam na sepse: cardiovascular, renal, pulmonar, hematológica, neurológica e hepática (HOTCHKISS et al., 2016). O coração é um dos órgãos-alvo mais vulneráveis (ZAKY et al., 2014; AN et al., 2016; LIU et al., 2019), sendo a lesão miocárdica frequentemente observada, com prevalência de até 40% na sepse (ZANOTTI-CAVAZZONI; HOLLEMBERG, 2009). A disfunção renal também é um fenótipo patológico importante durante a sepse e, na prática clínica, a lesão renal aguda é diagnosticada principalmente pela concentração de creatinina, que pode refletir parcialmente a taxa de filtração glomerular em função da eliminação do soluto pelo rim (LI et al., 2018). O sistema hepático não é tão frequentemente afetado quanto os rins, mas os pacientes sépticos com envolvimento hepático têm mortalidade muito alta (ANGUS et al., 2001; CRACIUN et al., 2014). Além disso, lesão hepática tem sido observada no modelo de sepse por CLP (DEUTSCHMAN et al., 2006; CRACIUN et al., 2014) e no cenário clínico, concentração elevada de TGP indica dano hepatocelular agudo e de TGO reflete o grau de lesão das células hepáticas, sendo as aminotransferases os índices mais comuns de dano hepatocelular (DOI et al., 2009; LI et al., 2018).

Atualmente, a disfunção orgânica não pode ser identificada com a precisão necessária para criar um padrão-ouro diagnóstico de sepse semelhante ao existente para outras doenças. Na ausência de tal padrão, critérios clínicos devem ser usados para construir modelos preditivos para sepse (COOPERSMITH et al., 2018). Os escores *Sequential Organ Failure*

Assessment (SOFA) e o *quick SOFA* (qSOFA) são sistemas de pontuação que usam dados clínicos como substitutos para a disfunção orgânica (FERREIRA et al., 2001). Pouco se sabe, no entanto, sobre a patobiologia da disfunção em sistemas orgânicos individuais que está associada a esses resultados. A identificação clínica baseia-se amplamente em substitutos (por exemplo, creatinina sérica, bilirrubina sérica, pressão arterial, escala de coma de Glasgow, contagem de plaquetas, frequência respiratória) (COOPERSMITH et al., 2018).

As definições do Sepsis-3 propuseram operacionalizar a detecção de disfunção de órgãos como um aumento no SOFA em 2 ou mais pontos, e esse critério foi escolhido com base em análises demonstrando que era altamente preditivo de mortalidade hospitalar em pacientes com suspeita de infecção (RHEE et al., 2019). No entanto, essa mudança na definição de sepsis é aplicada apenas à população adulta neste momento (KAWASAKI, 2017). Porém, embora o escore SOFA não tenha sido projetado para faixas etárias pediátricas, vários estudos recentes demonstraram, em princípio, a viabilidade de aplicar os critérios baseados no Sepsis-3 a faixas etárias pediátricas (MATICS; SANCHEZ-PINTO, 2017; SCHLAPBACH et al., 2018). Por outro lado, o desempenho do qSOFA na identificação de pacientes com disfunção orgânica foi ruim e pode não ter valor clínico suficiente para ser recomendado como ferramenta de triagem para faixas etárias pediátricas na Unidade de Terapia Intensiva (SCHLAPBACH et al., 2018). Atualmente, o sistema de pontuação frequentemente usado em pacientes pediátricos é o escore Pediatric Logistic Organ Dysfunction (PELOD), desenvolvido pela primeira vez em 1999, e modificado para o escore PELOD-2, que permite avaliar a gravidade da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos com boa validade (LETEURTRE et al., 2013), consistindo em 10 variáveis que representam 5 disfunções de órgãos. Um escore PELOD-2 alto se correlaciona com número maior de falências de órgãos e taxa de mortalidade (DEWI et al., 2019).

Nos últimos anos, novos conceitos mudaram a compreensão do que significa disfunção orgânica no contexto da doença crítica. O primeiro é que os órgãos podem desenvolver disfunção durante a sepsis na ausência de redução da oferta de oxigênio (LANGENBERG et al., 2006; PROWLE et al., 2009), sugerindo que a hipóxia tecidual pode não ser um mecanismo isolado, o que explica por que os esforços terapêuticos direcionados à perfusão podem resultar em melhora apenas parcial ou ausente (PROCESS INVESTIGATORS, 2014). Em segundo, pode ocorrer na ausência de morte celular significativa, sugerindo que a disfunção não se deve apenas a danos estruturais, mas a uma

paralisação das atividades celulares comuns (HOTCHKISS et al., 1999; LEROLLE et al., 2010; TAKASU et al., 2013).

O aumento da autofagia, ou seja, a digestão celular de componentes desnecessários ou disfuncionais, tem sido observado em múltiplos órgãos durante os estágios iniciais da sepse experimental (WATANABE et al., 2009; CARCHMAN et al., 2011; HSIAO et al., 2012) e documentada em humanos (WATANABE et al., 2009), ocorrendo em resposta à inflamação mediada pelo receptor do tipo Toll 4 (TLR-4) (WALTZ et al., 2011), estresse oxidativo (FRANK et al., 2012), e despolarização da membrana mitocondrial causada por desacoplamento da produção de ATP pela cadeia transportadora de elétrons (GREEN; GALLUZZI; KROEMER, 2011). Nesse contexto, a inibição induzida pela sepse nos complexos da cadeia transportadora de elétrons pode servir como um mecanismo de sinalização para ativar a autofagia (POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018). Além disso, a superativação da apoptose é uma característica patológica importante do dano tecidual durante a sepse (MENG et al., 2018; YANG, C. et al., 2019). No entanto, o mecanismo específico subjacente ao dano tecidual e à apoptose excessiva das células ainda precisa ser elucidado. Adicionalmente, o efeito da sepse na respiração mitocondrial e em complexos específicos da cadeia transportadora de elétrons foi documentado em modelos animais e de sepse humana, com redução significativa da atividade complexo I e IV da cadeia transportadora de elétrons em biópsias de músculo esquelético de pacientes graves, e nos modelos de sepse em fígado de roedores, sugerindo que isso seja mecanismo potencialmente universal (BREALEY et al., 2002, 2004; POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018).

Entretanto, séries de autópsias mostram relativamente pouca morte celular fora dos tecidos linfáticos, mesmo no choque séptico letal e na disfunção de múltiplos órgãos (TAKASU et al., 2013). Além disso, no tocante à disfunção metabólica celular, as proteínas mitocondriais e o DNA são danificados por altos níveis de ROS, e pacientes com sepse têm mitocôndrias danificadas e disfuncionais (BREALEY et al., 2002; TAKASU et al., 2013). Adicionalmente, há uma redução generalizada no gasto de energia no nível celular e muitas células viáveis reduzem o desempenho de funções especializadas (GARCIA-ALVAREZ; MARIK; BELLOMO, 2014; GOTTS; MATTHAY, 2016). Isto conduz ou exacerba a lesão renal aguda, a depressão miocárdica, a disfunção hepática, a encefalopatia, a lesão pulmonar aguda com o aumento da permeabilidade endotelial e epitelial do pulmão às proteínas e a diminuição das funções de barreira e transporte do trato gastrointestinal (DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014; GOTTS; MATTHAY, 2016).

Hochachka e Guppy propuseram que as células expostas a condições hipóxicas persistentes respondiam diminuindo a demanda de oxigênio (HOCHACHKA; GUPPY, 1987). Essa regulação negativa do metabolismo celular na sepse precoce é proposta para ser adaptativa, com o objetivo de redefinir o consumo de energia para limitar a lesão adicional, manter o balanço energético, prevenir danos no DNA e preservar a composição celular (SINGER et al., 2004; BREALEY et al., 2004; POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018). Portanto, a perda transitória da função parece ser um mecanismo adaptativo celular que pode explicar a disfunção orgânica precoce em resposta à sepse (POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018).

Vários ensaios experimentais e humanos demonstraram que alterações microcirculatórias são frequentes na sepse (VINCENT; DE BACKER, 2005), e a perfusão microvascular reduzida tem sido implicada na disfunção orgânica e falência de múltiplos órgãos associada à sepse. Os mecanismos precisos subjacentes à disfunção microvascular permanecem obscuros, mas existem dados experimentais consideráveis que mostram fluxo microcirculatório reduzido, particularmente de pequenos vasos, e aumento da heterogeneidade da distribuição do fluxo sanguíneo (DE BACKER et al., 2014). Dentre os mecanismos conhecidos que levam à disfunção microcirculatória incluem-se os padrões moleculares associados a danos e patógenos (DAMPs e PAMPs), estresse oxidativo e a produção alterada de óxido nítrico. Como resultado, o desnudamento do glicocálice altera o gradiente coloidosmótico entre o lúmen capilar e a área rica em proteínas protegida pela camada de glicocálice, levando ao aumento do extravasamento capilar e da adesão de plaquetas e neutrófilos (GÓMEZ; KELLUM, 2016). Tais mecanismos giram em torno da perda da autorregulação secundária à lesão de células endoteliais e alteração da comunicação celular endotelial retrógrada (TYML et al., 2001); comprometimento da deformidade das hemácias (KATZ et al., 1999) e aumento da viscosidade sanguínea (ASTIZ et al., 1995); ativação plaquetária; adesão e rolagem de leucócitos; e ativação dos sistemas de coagulação e complemento (DE BACKER et al., 2011; POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018).

O óxido nítrico (NO) também pode contribuir para a disfunção microcirculatória, pois a sepse é caracterizada por aumento global na produção de NO; no entanto, a expressão de um dos principais catalisadores da produção de NO, a isoforma indutível da Óxido Nítrico Sintase (iNOS), é distribuída heterogeneamente (CUNHA et al., 1994). Essa distribuição pode ser semelhante aos padrões de fluxo heterogêneo característicos da disfunção microvascular séptica (POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018), presumivelmente desacoplando a oferta de oxigênio da demanda e, assim, tornando a entrega de oxigênio e nutrientes menos eficiente

(GOLDMAN; BATEMAN; ELLIS, 2006). Além do risco de hipóxia, a diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo local pode estar associada à amplificação do sinal de inflamação. Em um modelo de CLP murino, observou-se aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de espécies reativas de nitrogênio (RNS) em até 4 horas após a exposição ao patógeno e, predominantemente, em áreas de fluxo sanguíneo reduzido ou ausente (WANG et al., 2012; POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018).

Assim, a disfunção orgânica na sepse é agora reconhecida por envolver múltiplas respostas à inflamação, incluindo disfunção endotelial e microvascular, desregulação imunológica e autônoma, e reprogramação metabólica celular (POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018). Entretanto, mais estudos são necessários para entender os fatores envolvidos no aumento do dano tecidual e encontrar estratégias que permitam reduzir este efeito negativo, aumentando as taxas de sobrevivência durante a sepse.

2.6 Estresse oxidativo durante a sepse

Nos dias de hoje, é amplamente aceito que o insulto infeccioso causado pela invasão de tecidos estéreis por patógenos representa apenas o início da sepse, enquanto o processo que leva à síndrome da sepse é subsequentemente mantido por uma cascata de mecanismos inflamatórios e oxidativos que, uma vez ativados, agem independentemente da presença dos próprios patógenos (BAJCETIC; SPASIC; SPASOJEVIC, 2014; POGGI; DANI, 2018). A estreita associação entre a resposta ao estresse oxidativo e a inflamação tem recebido crescente atenção nos últimos anos, e os efeitos da inflamação na função mitocondrial levam ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez, causam danos aos tecidos através da ativação do estresse oxidativo e amplificam ainda mais o processo inflamatório (DEJAGER et al., 2011; ANTHONYMUTHU; KIM-CAMPBELL; BAYIR, 2017; YANG, C. et al., 2019).

A sepse altera drasticamente a bioenergética e/ou o metabolismo (ARULKUMARAN et al., 2016; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016), pois aumenta a taxa metabólica, como refletido no consumo de oxigênio e na utilização geral do substrato (GIOVANNINI et al., 1983). Além disso, foi demonstrada redução da atividade nos complexos I, III, IV e ATP sintase da cadeia transportadora de elétrons (BREALEY et al., 2002; LEVY; DEUTCHMAN, 2007). Adicionalmente, sabe-se que a sepse altera a preferência do substrato, com diminuição na utilização de glicose (intolerância à glicose) em relação a gordura e proteína (STONER et al., 1983; WHITE et al., 1987; COOPERSMITH et al., 2018). Como resultado, pacientes

sépticos tendem a ser hiperglicêmicos. Em estágios posteriores, a oxidação de ácidos graxos também pode ser prejudicada, como refletido nos níveis séricos elevados de lipoproteínas, ácidos graxos livres e triglicerídeos. A glicólise é preferida à fosforilação oxidativa, apesar da disponibilidade adequada de oxigênio (“glicólise aeróbica”, às vezes chamada de Efeito Warburg) (YANG et al., 2014; SRIVASTAVA; MANNAM, 2015; SCHMOCH et al., 2017; COOPERSMITH et al., 2018).

O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre oxidação e antioxidação, resultando na produção excessiva de ROS (YANG C. et al., 2019). As mitocôndrias produzem mais de 90% da energia celular do corpo na forma de ATP via fosforilação oxidativa (GALLEY, 2010) e representam uma importante fonte de ROS intracelular através da redução incompleta de oxigênio pela cadeia transportadora de elétrons (MURPHY, 2009; WEISS; DEUTSCHMAN, 2014). Na sepse, a fosforilação oxidativa desacoplada e a sobrecarga da proteção antioxidante são mecanismos que levam ao aumento das ROS (GALLEY, 2010; VON DESSAUER et al., 2011), que reagem com componentes celulares críticos como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (BAR-OR et al., 2015; TSIKAS, 2017). Deste processo resulta a disfunção mitocondrial com perda do potencial da membrana interna, inibição da cadeia transportadora de elétrons e consequente depleção de ATP, aumento dos níveis de lactato e liberação de proteínas pró-apoptóticas (PRAUCHNER, 2017), cujos danos acumulados podem impedir a função celular (WEISS; DEUTSCHMAN, 2014). Assim, nos últimos anos, ficou mais claro que a disfunção das mitocôndrias e os déficits energéticos das células estão relacionados à falência de órgãos e aos piores resultados de pacientes sépticos (PRAUCHNER, 2017; POGGI; DANI, 2018).

Em 2014 Chouchani et al. publicaram um relatório sobre o mecanismo de isquemia-reperfusão, concluindo que condições hipóxicas induzem alteração mitocondrial no complexo II, também conhecido como succinato desidrogenase, e a reperfusão leva a uma explosão de succinato, resultando na geração de muitos radicais livres. Essas são exatamente as condições que imitam a isquemia (sepse) e reperfusão (tratamento com oxigênio e ventilação mecânica) que levam à produção maciça de espécies reativas de oxigênio no modelo de roedor mencionado acima (CHOUCHANI et al., 2014; BAR-OR et al., 2015). Além disso, existem evidências de que a sepse leva ao acúmulo de succinato (TANNAHILL et al., 2013).

Como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio têm meia-vida muito curta, a demonstração da formação de radicais livres é extremamente difícil. Portanto, as medidas de estresse oxidativo têm-se baseado na quantificação de subprodutos da oxidação de

macromoléculas (WEISS; DEUTSCHMAN, 2014). O malondialdeído (MDA) é um dos subprodutos da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), responsável pela formação de ROS e pela extensão do dano oxidativo (HAILESELASSIE et al., 2017; YANG, C. et al., 2019), estando entre as espécies tóxicas que podem perturbar a estrutura e a função das proteínas (SLATTER et al., 1999). Formado durante a degradação dos fosfolipídios da membrana celular (WEISS; DEUTSCHMAN, 2014) é um biomarcador amplamente aceito do estresse oxidativo, a saber, da peroxidação lipídica (TSIKAS, 2017; YANG, Z. et al., 2019). Lorente et al. demonstraram níveis séricos de MDA significativamente mais altos em pacientes sépticos não sobreviventes do que nos sobreviventes, independentemente do local de infecção, tipo de microrganismo ou sistema de órgãos disfuncional, sugerindo que a peroxidação lipídica era atribuível à resposta geral do hospedeiro, em vez de uma reação patogênica ou específica do órgão (LORENTE et al., 2013; WEISS; DEUTSCHMAN, 2014).

A ocorrência do estresse oxidativo na sepse está bem documentada, sendo justificado tentar reduzir seus efeitos deletérios aumentando os antioxidantes nesses pacientes (BAR-OR et al., 2015). Como as mitocôndrias disfuncionais são o principal fator de comprometimento de órgãos durante a sepse (POGGI; DANI, 2018), o tratamento antioxidante direcionado às mitocôndrias parece promissor. Entretanto, mais estudos são necessários para identificar agentes úteis e padronizar o tratamento antioxidante.

2.7 Lactato

O lactato sanguíneo é um metabólito da glicólise que pode ser utilizado para produção de energia por mitocôndrias locais ou distantes (piruvato e depois pelo ciclo de Krebs) ou como substrato da gliconeogênese (ciclo de Cori) (SUETRONG; WALLEY, 2016; LI et al., 2018). Sob condições fisiológicas, o lactato é produzido a uma taxa notavelmente alta, de aproximadamente 1,5 mol por dia, principalmente no músculo esquelético, pele, cérebro, intestino e eritrócitos, não sendo simplesmente um produto residual que indica metabolismo anaeróbico (LEVY, 2006; SUETRONG; WALLEY, 2016). É metabolizado pelo fígado (cerca de 60%), rins (cerca de 30%) e outros órgãos (LEVY, 2006; VINCENT et al., 2016; SUETRONG; WALLEY, 2016).

A glicólise é uma via que normalmente acontece em condições anaeróbicas e é relativamente ineficiente na produção de ATP, pois produz duas moléculas de ATP a partir de uma molécula de glicose (ARTS et al., 2017). No entanto, é uma via rápida para geração de energia e pode ser potencializada por meio de estímulos, como ligantes de TLR ou citocinas

(YANG et al., 2014; BHAN et al., 2016; CHENG et al., 2016; ARTS et al., 2017). A glicólise metaboliza glicose em piruvato, que é catalisado pela fosfofrutoquinase na via Ebden-Meyerhof (BAR-EVEN et al., 2012). O metabolismo adicional do piruvato segue uma das duas rotas. Primeiro, sob condições aeróbicas, é convertido nas mitocôndrias pelo piruvato desidrogenase em acetil coenzima A, que entra no ciclo do ácido tricarboxílico (Krebs), permitindo a geração de 38 moléculas de ATP para cada molécula de glicose. A segunda via para o piruvato é a conversão para ou a partir de lactato no citosol representada pela reação: $\text{piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftarrow \rightarrow \text{lactato} + \text{NAD}^+$ (LEVY, 2006; KRAUT; MADIAS, 2014). Quando não há oxigênio suficiente, o ciclo de Krebs não pode metabolizar piruvato, portanto, é gerado lactato. É importante ressaltar que em pacientes com sepse, o aumento do fluxo glicolítico que excede a capacidade oxidativa das mitocôndrias resulta em aumento da produção de piruvato e, portanto, produção de lactato (SUETRONG; WALLEY, 2016).

O aumento da concentração de lactato sanguíneo (hiperlactatemia) e acidose láctica são comuns em pacientes com sepse ou choque séptico e tem sido tradicionalmente interpretado como marcador de hipóxia tecidual (KIM, Y. et al., 2013; GARCIA-ALVAREZ; MARIK; BELLOMO, 2014; FILHO et al., 2016; SUETRONG; WALLEY, 2016; ZHAI et al., 2018). Na sepse, os processos inflamatórios endoteliais resultam em disfunção microcirculatória, de modo que o fornecimento regional e microrregional de oxigênio não é compatível com a demanda, gerando lactato. Além disso, a doença crítica geralmente causa uma alteração metabólica na fosforilação oxidativa mitocondrial para a glicólise aeróbica que está associada à produção de lactato (mesmo em tecidos com oxigenação adequada), disfunção de múltiplos órgãos e resultados desfavoráveis (SUETRONG; WALLEY, 2016; VINCENT et al., 2016).

Deste modo, a formação de lactato durante a sepse não está totalmente relacionada à hipóxia tecidual ou reversível aumentando a oferta de oxigênio (SUETRONG; WALLEY, 2016; BROOKS, 2018). Essa visão é muito simplificada e não leva em consideração as várias alterações metabólicas no contexto da sepse que podem contribuir para a elevação do lactato na ausência de hipóxia tecidual ou em adição a esta, como aumento do fluxo glicolítico, atividade da bomba de Na-K estimulada por catecolamina, disfunção mitocondrial e alterações na atividade da piruvato desidrogenase (CASSERLY et al., 2015; VINCENT et al., 2016; SUETRONG; WALLEY, 2016). Além disso, os pulmões podem produzir lactato durante lesão pulmonar aguda sem hipóxia tecidual e os leucócitos também geram lactato durante a fagocitose ou quando ativados na sepse (SUETRONG; WALLEY, 2016).

Adicionalmente, embora a redução da depuração hepática de lactato não ocorra em todos os pacientes sépticos, isso se torna uma questão importante quando há disfunção hepática preexistente ou nova (REVELLY et al., 2005; MICHAELI et al., 2012; SUETRONG; WALLEY, 2016). Logo, os níveis elevados de lactato podem ser o resultado de aumento de produção, eliminação reduzida ou ambos (VINCENT et al., 2016).

As definições mais recentes de sepse e choque séptico (Sepsis-3) enfatizam a importância do lactato em refletir a gravidade e a identificação precoce da sepse em humanos (SINGER et al., 2016). Além disso, a combinação de hiperlactatemia com hipotensão resistente a fluidos identifica um grupo com mortalidade particularmente alta e, portanto, fornece um identificador mais robusto do conceito fisiológico e epidemiológico de choque séptico do que qualquer um dos critérios isoladamente (SINGER et al., 2016). Pesquisas apontam o lactato como um dos melhores preditores da gravidade na sepse pediátrica (SCOTT et al., 2017; SCOTT; KEMPE; BAJAJ, 2017; SCHLAPBACH; KISSOON, 2018), e sugere-se que os níveis séricos deste metabólito estão associados à mortalidade no choque séptico, mesmo na ausência de hipotensão (CASSERLY et al., 2015). Desta forma, a medida do lactato é frequentemente incorporada no manejo clínico da doença crítica, particularmente em casos de sepse e choque séptico, para avaliar a gravidade da doença, a resposta ao tratamento e o prognóstico (SUETRONG; WALLEY, 2016; NOLT et al., 2018).

Assim, considerando que a riboflavina demonstrou atividade anti-inflamatória em modelos experimentais de inflamação local e sistêmica (TOYOSAWA et al., 2004a, 2004b; KODAMA et al., 2005), é plausível se pensar que também possa contribuir para redução do lactato durante a sepse. No entanto, as causas da hiperlactatemia no contexto da sepse ainda não estão completamente elucidadas e a disfunção microcirculatória resultante da inflamação endotelial representa apenas parte do processo.

2.8 Considerações gerais sobre a Riboflavina

A riboflavina (vitamina B2) foi isolada pela primeira vez a partir do soro do leite no final da década de 1870 como o pigmento amarelado chamado lactocromo e, estruturalmente estabelecida como riboflavina, na década de 1930 (PINTO; ZEMPLINI et al., 2016). É uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B, sintetizada por plantas, leveduras e bactérias, mas não por mamíferos, sendo adquirida a partir de fontes alimentares como leite, carne, peixe, ovos, vegetais de cor verde escuro e algumas bactérias da microbiota intestinal (POWERS, 2003; YOSHII et al., 2019).

Suas formas biologicamente ativas mais importantes são a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a flavina mononucleotídeo (FMN), que atuam como cofatores de desidrogenases, redutases e oxidases, participando de uma série de processos celulares envolvendo metabolismo oxidativo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, sinalização celular e ativação de outras vitaminas do complexo B, notadamente folato e vitamina B6. Além disso, em estado reduzido, pode doar elétrons ao complexo II da cadeia transportadora de elétrons, sendo essencial para a geração de energia na célula aeróbica, através da fosforilação oxidativa (POWERS; CORFE; NAKANO, 2012; SCHRAMM et al., 2014; PINTO; ZEMPLINI, 2016).

A riboflavina não convertida em FMN ou FAD é excretada pelos rins, resultando em urina de cor amarela, e as taxas de secreção tubular renal aumentam de forma linear com doses crescentes (CHASTAIN; MCCORMICK, 1987; PINTO; ZEMPLINI, 2016). Embora relativamente estável, é facilmente degradada pela luz (PEECHAKARA; GUPTA, 2019). É considerada uma vitamina bem tolerada, barata e segura, pois efeitos tóxicos ou adversos da ingestão de doses elevadas da riboflavina não foram relatados até o momento (GALLAGHER, 2012; SAID; ROSS, 2013; SHERWOOD; GOLDMAN, 2014).

As vitaminas são micronutrientes que têm efeitos fisiológicos em várias respostas biológicas, incluindo a imunidade do hospedeiro (YOSHII et al., 2019). A deficiência de riboflavina está associada a queilite angular, fissuras labiais, diminuição na absorção de ferro e mobilização da ferritina dos tecidos, com consequente anemia, retardo de crescimento, déficits de atenção e habilidades motoras, desordens neuromusculares, neurológicas e câncer (NICHOLS et al., 2013; SCHRAMM et al., 2014; MAHABADI; BHUSAL; BANKS, 2019). Atualmente, é utilizada para prevenção de ampla gama de doenças como catarata, anemia, hipertensão, enxaqueca em adultos e para tratamento da progressão de distúrbios da córnea, como ceratocone e glaucoma (PINTO; ZEMPLINI, 2016; THAKUR et al., 2017; MAHABADI; BHUSAL, 2019).

Em vários modelos experimentais relacionados à lesão por isquemia-reperfusão, a administração de riboflavina resultou em diminuição da agressão tecidual em consequência do estresse oxidativo (BETZ et al., 1994; SEEKAMP; HULTQUIST; TILL, 1999; SANCHES et al., 2014). A riboflavina pode atuar como antioxidante contra o estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e, especialmente, na lesão oxidativa de reperfusão. Os mecanismos pelos quais ela protege o organismo contra o estresse oxidativo podem ser atribuídos ao ciclo redox da glutatona e também a outros possíveis mecanismos, como a conversão de riboflavina

reduzida à forma oxidada. Além disso, como a FAD é um substrato essencial à cadeia de transporte de elétrons, a administração de riboflavina poderia estimular a fosforilação oxidativa e a produção de ATP. No entanto, a maioria das investigações nesta área se limita a estudos experimentais e, por conseguinte, novas investigações devem examinar o efeito de riboflavina através de estudos observacionais e de intervenção em humanos (ASHOORI; SAEDISOMEOLIA, 2014).

De acordo com relatos prévios, a vitamina B2 aumentou a resistência do hospedeiro à infecção (ARAKI et al., 1995), estimulou as funções de neutrófilos (OSAME; ARAKI; KIMURA, 1995) e aumentou a função dos macrófagos quando administrada profilaticamente (KIMURA; SUZUKI; ARAKI, 1996). Esses achados levantaram a possibilidade de a vitamina B2 melhorar a inflamação e a regulação do sistema imune do hospedeiro na sepse, embora seus efeitos terapêuticos ainda não estejam estabelecidos (TOYOSAWA et al., 2004a).

Adicionalmente, alguns estudos demonstraram atividade anti-inflamatória da riboflavina em modelos experimentais de inflamação local e sistêmica. A administração endovenosa de riboflavina aumentou significativamente as taxas de sobrevivência e reduziu os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, INF- γ e MIP-2, e de óxido nítrico (NO) em modelo experimental de sepse murina induzida por toxina ou por infecção bacteriana (TOYOSAWA et al., 2004a, 2004b). Estudo semelhante, empregando protocolo de sepse letal induzida por lipopolissacáride (LPS) de *E. coli*, demonstrou redução das concentrações plasmáticas e pulmonares das citocinas IL-6 e MIP-2, dos níveis plasmáticos de NO e da quantidade da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) no fígado de camundongos tratados com riboflavina endovenosa em comparação ao grupo controle (KODAMA, et al., 2005). Além disso, um estudo utilizando camundongos deficientes em riboflavina quinase (RFK), responsável pela conversão da riboflavina em FNM, resultou em redução da produção de ROS, através do primer da NADPH oxidase 2, por neutrófilos e macrófagos, indispensáveis para a inativação de micro-organismos fagocitados e consequente defesa do hospedeiro contra a infecção por *Listeria monocytogenes* in vitro e in vivo (SCHRAMM et al., 2014; YOSHII et al., 2019).

No entanto, os papéis imunológicos da vitamina B2 no controle da imunidade do hospedeiro ainda não são completamente compreendidos, sendo necessários novos estudos para elucidação.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente o tratamento da sepse permanece inespecífico e de suporte (COOPERSMITH et al., 2018). Contudo, apesar do uso de antibióticos de amplo espectro, muitos pacientes sucumbem em virtude de disfunção orgânica (MEDZHITOV, 2013; HOTCHKISS et al., 2016). Sabe-se que a má utilização do oxigênio pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial na sepse leva a acentuado estresse oxidativo que, associado à resposta inflamatória excessiva, causa disfunção mitocondrial, morte celular e, consequentemente, falência de múltiplos órgãos (POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018).

Considerando que o estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese da disfunção orgânica induzida pela sepse (WEISS; DEUTSCHMAN, 2014) e, tendo como alvo principal a disfunção mitocondrial dentro do complexo processo da sepse, substâncias que atuem especificamente nas mitocôndrias poderiam ser benéficas, como antioxidantes e estimuladores da fosforilação oxidativa, como a riboflavina.

Assim, como têm sido relatados benefícios antioxidantes da riboflavina em vários modelos experimentais relacionados à lesão por isquemia-reperfusão, em que a administração desta droga resultou em diminuição da agressão tecidual em consequência do estresse oxidativo (BETZ et al., 1994; SEEKAMP; HULTQUIST; TILL, 1999; SANCHES et al., 2014), bem como atividade anti-inflamatória em estudos experimentais de inflamação sistêmica (TOYOSAWA et al., 2004a, 2004b; KODAMA et al., 2005), este estudo propõe a avaliação dos possíveis benefícios desta vitamina relativamente barata e não tóxica sobre o estresse oxidativo, a lesão mitocondrial, a disfunção de órgãos, a resposta inflamatória e a mortalidade, utilizando modelo experimental de sepse induzida por CLP em camundongos.

4 HIPÓTESE

Nossa hipótese é de que a administração de riboflavina a camundongos sépticos reduz a disfunção orgânica e a mortalidade, comparada com placebo.

5 OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo primário avaliar se a administração de riboflavina a camundongos com sepse induzida pela CLP reduz a mortalidade, comparada com placebo. Os objetivos secundários incluíram avaliar se a riboflavina reduz a disfunção orgânica e se apresenta efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e de redução da carga bacteriana nos animais sépticos.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo: estudo de experimentação animal

6.1 Animais Experimentais

Foram utilizados em todos os experimentos camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6 (*Wild type*, WT), machos, de 6 a 8 semanas, pesando entre 18 e 25g, provenientes do biotério da USP-Ribeirão Preto, e mantidos sob condições de temperatura entre 23 e 25°C, ciclos claro/escuro controlados de 12 horas e com livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, São Paulo, Brasil (Protocolo nº 009/2016).

6.2 Protocolos experimentais

6.2.1 Modelo de sepse polimicrobiana

Para indução da sepse polimicrobiana foi utilizado o modelo experimental de sepse induzida pela CLP, originalmente descrita por Baker e colaboradores (BAKER et al., 1983), com algumas modificações (FERREIRA et al., 2014). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), por via intraperitoneal (i. p.) e realizada uma incisão mediana de aproximadamente 1 cm no abdômen a fim de expor o ceco. Este foi ligado com um fio de algodão, abaixo da válvula ileocecal, onde foram feitas duas perfurações com agulha 18G estéril para induzir a sepse letal, isto é, com 100% de mortalidade (FERREIRA et al., 2014). Em seguida, o ceco foi pressionado sutilmente para promover a saída de fezes pelas perfurações e recolocado no abdômen, sendo a incisão suturada. Logo após, todos os camundongos receberam injeção de 1 ml de salina por via subcutânea para evitar desidratação e foram mantidos sob aquecimento com auxílio de uma lâmpada incandescente até o término do efeito do anestésico.

6.2.2 Grupos de camundongos, tratamento com riboflavina e coleta de sangue e lavado peritoneal para análise

Para realização dos experimentos, os camundongos C57BL/6 foram alocados aleatoriamente em três grupos: grupo controle, grupo de estudo e naive. Os animais dos grupos controle e de estudo foram submetidos à CLP e, para diminuir a mortalidade de 100% observada no modelo experimental de sepse, conforme descrito no item 6.2.1, todos os animais foram tratados pela via i. p. com antibiótico Ertapenem sódico (Laboratório de Pesquisa Merck, Whitehouse Station, NJ) na dose de 30 mg/Kg em volume de 200 uL de solução salina 0,9%. A administração foi realizada a partir da 6ª hora após a cirurgia (dia 0), em dose única (NASCIMENTO et al., 2010) (Figura 1).

Os camundongos do grupo de estudo, além da antibioticoterapia, receberam 6 horas após a CLP a droga riboflavina (**riboflavina 5' monofosfato de sódio**) (*Sigma-Aldrich Laboratories*) na dose de 20 mg/Kg em um volume de 200 uL de solução salina 0,9%, via plexo venoso retro-ocular, uma única vez, sob anestesia inalatória com isoflurano a 2% em todos os experimentos. Nos experimentos 1, 2, 3, 5 e 6 (Figura 2) os camundongos do grupo controle receberam somente o antibiótico, 6 horas após indução da CLP. Entretanto, para retirar o viés de somente o grupo de estudo ser submetido à anestesia inalatória no referido período, pois como qualquer outro medicamento, o isoflurano pode não ser isento de efeitos colaterais e estudos anteriores observaram reduções nos marcadores séricos de inflamação com anestésicos voláteis (LEWIS et al., 2016), os camundongos do grupo controle nos experimentos 4 e 7 (Figura 2) também foram anestesiados com isoflurano a 2% e receberam 200 uL de solução salina 0,9% via plexo venoso retro-ocular, porém sem a riboflavina.

O grupo naive (controle não operado), igualmente alocado de forma aleatória, não recebeu antibiótico nem a droga em estudo, a riboflavina, sendo apenas eutanasiado conforme descrito no item 6.5, juntamente com o grupo de estudo e o grupo controle, para coleta de sangue e do lavado peritoneal visando a quantificação de bactérias, dosagem de citocinas e determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Este grupo foi utilizado para confirmação do desenvolvimento da sepse nos grupos submetidos à CLP, pois estudos prévios realizados no laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto confirmaram a sepse 12h após a CLP pela presença de bacteremia e elevação dos níveis séricos de citocinas inflamatórias (NASCIMENTO et al., 2010). Optamos por utilizar o grupo naive como controle do procedimento, pois foi demonstrado que, pelo menos em protocolos

envolvendo indução da sepse por CLP, não há diferença na resposta inflamatória e imune entre camundongos naïve e falso operados (*sham*) (NASCIMENTO et al., 2010).

Com exceção dos experimentos de sobrevivência (experimentos 6 e 7) (Figura 2), nos demais, os camundongos foram eutanasiados 12 horas após a CLP para a coleta de sangue e lavado peritoneal. A CLP usada em modelos de roedores tem limitações comuns à maioria dos pequenos modelos animais, e a principal delas é a incapacidade de obter amostras de sangue em série durante longos períodos de tempo para testes que consomem volumes substanciais (HUBBARD et al., 2005). Deste modo, foram realizados vários experimentos e no fluxograma do estudo (Figura 2) a metodologia acima descrita foi resumida e as análises realizadas em cada experimento, especificadas.

As diretrizes para estudos pré-clínicos de sepse publicada em 2018 preconizam que os antimicrobianos devam ser escolhidos com base no modelo e no patógeno provável/conhecido, e iniciados após o estabelecimento da sepse (OSUCHOWSKI et al., 2018), para evitar a morte de todos os camundongos, pela falha do controle bacteriano. Dessa forma, utilizamos em nosso estudo, 6 horas após a CLP, o ertapenem, um antibiótico β -lactâmico de amplo espectro com propriedade bactericida, desenvolvido para o tratamento antimicrobiano de primeira linha para infecções intra-abdominais (El-GAMAL et al., 2017). A escolha do antibiótico se baseou no fato de que o modelo de CLP induz a sepse polimicrobiana, com a presença de flora Gram positiva e Gram negativa do ceco, incluindo bactérias aeróbicas e anaeróbicas (por exemplo, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus sp.*, *Bacteroides fragilis*, entre outras) (HUBBARD et al., 2005). Embora a duração da antibioticoterapia tenha variado muito nos diversos estudos baseados no modelo de CLP, praticamente todos usaram um antibiótico à base de carbapenêmico (ISKANDER et al., 2016).

Figura 1. Esquema dos grupos de camundongos, tempo de tratamento e coleta de materiais para análise.

6.3 Preparo de Soluções

Solução tamponada fosfatada (PBS) – solução mãe 10X (pH 7,4)

Cloreto de Sódio----- 80 g

Cloreto de Potássio -----2 g

Fosfato de Potássio monobásico ----- 2 g

Fosfato de Sódio dibásico heptahidratado -----16,86 g

Água mili-Q-----1000 mL

Anestésico à base de quetamina e xilasina

Quetamina 10% ----- 6 mL

Xilasina 6% ----- 3,6 mL

Solução de NaCl 0,9% -----50,4 mL

6.4 Determinação de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi avaliada 12 horas após a indução da sepse. Para isso, os camundongos foram eutanasiados, a pele do abdômen foi aberta com uma incisão mediana, sem lesar a musculatura, e a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de tampão PBS contendo EDTA (1nM). A partir do lavado peritoneal, foram feitas as contagens total e diferencial. A contagem total de leucócitos foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial foram utilizadas alíquotas do lavado peritoneal, as quais foram centrifugadas a 500 rpm por 7 minutos (Cytospin 3; SHANDON®), sendo as células posteriormente fixadas em lâminas de vidro e, em seguida, coradas com corante Panótico Rápido, de acordo com as indicações do fabricante (Merz e Dade). As lâminas foram examinadas em microscópio óptico com objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 vezes). Foram contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se dois tipos celulares: neutrófilos e mononucleares. Em seguida, a porcentagem de cada tipo celular foi relacionada ao número de leucócitos encontrados na contagem total. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos presentes no lavado peritoneal $\times 10^6$ /cavidade.

6.5 Quantificação de bactérias no sangue e no lavado peritoneal

Para a quantificação do número de bactérias no sangue e no lavado peritoneal os camundongos foram eutanasiados com uma dose letal de anestésico, 12 horas após a indução da sepse. Uma alíquota de aproximadamente 50 μ L de sangue foi coletada por meio do plexo ocular em tubo contendo 10 μ L de heparina (10 U/mL), e cerca de 10 μ L de sangue foi semeada no meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) com diluição 1:10 e sem diluições, experimento 1, 2 e 4, respectivamente (Figura 2). Para avaliar a quantidade de bactérias no foco da infecção, o peritônio foi lavado com 2 mL de tampão PBS contendo 1 mM de EDTA (Sigma, St Louis, MO USA). Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis. O lavado peritoneal foi então diluído em PBS estéril e 10 μ L dessa solução semeada em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 18 horas a 37°C e o número de unidades formadoras de colônias (CFU) foi quantificado. Os resultados foram expressos como Log de CFU/mL.

6.6 Quantificação de citocinas

As quantificações de IL- 6, quimiocina derivada de queratinócitos (KC), TNF- α (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA), e proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2) (R&D Systems, Inc. McKinley Place NE, Minneapolis, USA) foram realizadas no soro e no lavado peritoneal dos animais sépticos 12 horas após a CLP. A quantificação dos níveis destas citocinas foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme descrito pelo fabricante. Os resultados das quantificações de IL-6, KC e MIP-2 foram expressos em ng/mL, e o TNF- α em pg/mL.

6.7 Dosagem de lactato

As concentrações de lactato foram quantificadas no plasma de camundongos sépticos utilizando o Kit de Lactato (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. O método para determinação do Lactato foi o Teste UV enzimático, no qual a Lactato Desidrogenase (LDH) catalisa a oxidação do L-Lactato a Piruvato, com consequente redução do NAD⁺ a NADH. A concentração de L-Lactato é medida pelo aumento da absorbância a 340 nm, a partir da formação de NADH. Os resultados foram expressos em mg/dL de plasma.

6.8 Determinação dos parâmetros bioquímicos

A disfunção renal foi avaliada por meio das concentrações de ureia e creatinina, a disfunção cardíaca, pela concentração da isoenzima creatinina quinase-MB (CK-MB) e a disfunção hepática, pelas concentrações das enzimas transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP). Para a determinação das concentrações séricas dos marcadores bioquímicos de disfunção orgânica, os camundongos sépticos foram eutanasiados 12 horas após a CLP e o sangue coletado por meio do plexo ocular. Em seguida, o material foi centrifugado por 2 minutos a 10000 g, o soro coletado e armazenado a -20°C. As concentrações de TGO, TGP, CK-MB e ureia foram determinadas no soro por meio de um kit analítico (Labtest, Lagoa Santa, Brasil), e a creatinina no soro pelo método colorimétrico pelo Kit analítico (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), seguindo as orientações do fabricante. Os resultados foram expressos em U/mL de soro para TGO, TGP, em U/L de soro para CK-MB, e em mg/dL de soro para creatinina e ureia.

6.9 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA)

Utilizamos a peroxidação lipídica como parâmetro de medida indireta do estresse oxidativo aos lipídios no soro. O ensaio baseia-se no princípio da espectrofotometria, onde o ácido tiobarbitúrico reage com aldeídos resultantes da peroxidação lipídica, gerando espécies quantificáveis em leitura no espectrofotômetro (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

Para a determinação das concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os camundongos sépticos foram eutanasiados e o sangue coletado por meio do plexo ocular 12 horas após a CLP. Em seguida, o material foi centrifugado por 2 minutos a 10000 g, o soro coletado e armazenado a -20°C. Foram misturados 100 µL de soro às soluções de dodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1%), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6% e tampão de ácido acético (ácido acético glacial 15% + ácido clorídrico 4,5%; pH 3,5, corrigido com hidróxido de sódio em micropérolas) em tubos de vidro. Após agitação, os tubos foram incubados em banho-maria a 95°C por uma hora. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e a leitura dos produtos da reação gerados foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de emissão a 532 nm. A quantificação das amostras foi feita com base no cálculo por meio da equação da reta obtida por curva padrão com concentrações conhecidas e crescentes de MDA. Os resultados foram expressos em mmol/L.

6.10 Determinação da taxa de sobrevida de camundongos submetidos à sepse e tratados com antibioticoterapia ou antibioticoterapia e riboflavina

Para a determinação da taxa de sobrevivência, após serem submetidos ao procedimento de CLP, conforme descrito anteriormente no item 6.2.1, os camundongos foram tratados com ertapenem ou ertapenem e riboflavina (riboflavina 5'-monofosfato de sódio) (*Sigma-Aldrich* Laboratories) 6 horas após a cirurgia. Os camundongos foram mantidos sob condições de temperatura entre 23 e 25°C, ciclos claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a ração e água. O número de camundongos mortos foi atualizado de 12 em 12 horas e utilizado para a construção do gráfico de sobrevida. No final de 7 dias, os camundongos que sobreviveram foram eutanasiados.

Figura 2. Fluxograma do estudo e experimentos realizados. Legenda: CLP, ligadura e punção do ceco; Cr, creatinina; Ur, ureia; CK-MB, Creatine quinase-MB; TGO, transaminase glutâmico oxalacética; TGP, transaminase glutâmico pirúvica; IL-6, interleucina 6; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; KC, quimiocina derivada de queratinócitos ; MIP-2, proteína inflamatória de macrófagos-2; MDA, malondialdeído.

6.11 Análise estatística

Os dados foram expressos em média, desvio padrão, mediana, variação e intervalo interquartil. Para comparação das médias entre os grupos, foram ajustados modelos de regressões lineares sob abordagem Bayesiana, obtendo-se estimativas de diferenças entre as médias e intervalos de credibilidade 95% (ICr95%). Foi realizada análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier, e as diferenças estatísticas entre as curvas foram avaliadas utilizando o teste log-rank. Para a realização das análises estatísticas supracitadas foi utilizado o software OpenBUGS e o pacote JAGS do software R 3.5.1. O número amostral foi representado na legenda de cada figura, variando de 4 a 7 animais.

7 Resultados

7.1 Quantificação de bactérias no sangue

O crescimento bacteriano no sangue ocorreu nos grupos de camundongos submetidos ao procedimento de CLP em comparação aos naives nos experimentos 2 e 4 (Figuras 3B e 3C, respectivamente). Entretanto, no experimento 1 (Figura 3A), onde houve a diluição do sangue precedendo a semeadura, não identificamos crescimento de bactérias na maioria dos camundongos. Na comparação da carga bacteriana entre os grupos submetidos à CLP, não houve diferença significativa em nenhum dos experimentos (Figura 3 e Tabelas 1 e 2). Assim, neste modelo de indução de sepse não observamos redução da proliferação bacteriana nos animais tratados com riboflavina.

Tabela 1 - Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo da quantificação de bactérias no sangue (Log_{10} UFC/mL) dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil Inferior	Mediana	Quartil Superior	Máximo
EXPERIMENTO 2								
G1	6	4,48	0,65	3,72	3,96	4,39	5,18	5,24
G2	6	3,36	1,66	0	3,65	3,94	4,27	4,33
EXPERIMENTO 4								
G1	7	1,19	1,11	0	0	2,0	2,0	2,3
G2	7	2,01	1,44	0	0	2,3	3,04	3,56

Legenda: G1= Grupo controle (CLP+ertapenem), G2= Grupo de estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), N= número de observações

Tabela 2 – Comparação da quantificação de bactérias no sangue (Log_{10} UFC/mL) dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

EXPERIMENTO	Comparações	Diferença entre médias	LI ICr 95%	LS ICr 95%
1	G1-G2	*	*	*
2	G1-G2	1,12	-0,34	2,87
4	G1-G2	-0,81	-2,34	0,64

Legenda: G1= Grupo controle (CLP+ertapenem), G2= Grupo de estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), LI= limite inferior, LS= limite superior, ICr= intervalo de credibilidade, , * = não foi possível realizar a análise dos dados, pois um grupo é todo formado por observações iguais a zero.

Figura 3. Representação da quantificação de bactérias no sangue dos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP. (A) experimento 1 com n= 4 a 5, (B) experimento 2 com n= 5 e (C) experimento 4 n= 7 camundongos/grupo; três experimentos independentes.

7.2. Quantificação de bactérias no lavado peritoneal

Foi observado crescimento bacteriano no lavado peritoneal de todos os camundongos dos grupos submetidos à CLP nos experimentos 1 e 4 (Figura 4A e 4C, respectivamente). Contudo, no experimento 2, onde realizou-se uma maior diluição antes da semeadura, não houve crescimento bacteriano em alguns camundongos no local considerado foco da infecção (Figura 4B). Na comparação da carga bacteriana entre os grupos submetidos à CLP, não houve diferença significativa nos três experimentos independentes (Figura 4 e Tabelas 3 e 4). Logo, não observamos redução da proliferação bacteriana nos animais tratados com riboflavina.

Tabela 3 - Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo da quantificação de bactérias no lavado peritoneal (Log_{10} UFC/mL) dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil Inferior	Mediana	Quartil Superior	Máximo
EXPERIMENTO 1								
G1	5	3,9	2,24	0	4	4,7	5	5,66
G2	5	5,8	0,79	4,84	5,50	5,8	5,92	7,02
EXPERIMENTO 2								
G1	6	3,17	3,51	0	0	2,80	5,99	7,29
G2	6	4,32	3,45	0	1,37	5,63	6,60	7,81
EXPERIMENTO 4								

G1	7	5,81	0,35	5,30	5,45	5,87	6,17	6,27
G2	7	5,72	1,01	4,30	4,48	5,76	6,70	6,86

Legenda: G1= Grupo controle (CLP+ertapenem), G2= Grupo de estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), N= número de observações.

Tabela 4 - Comparação da quantificação de bactérias no lavado peritoneal (Log_{10} UFC/mL) dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

EXPERIMENTO	Comparações	Diferença entre médias	LI ICr 95%	LS ICr 95%
1	G1-G2	1,98	-0,55	4,50
2	G1-G2	1,20	-3,37	5,61
4	G1-G2	0,08	-0,9	0,85

Legenda: G1= Grupo controle (CLP+ertapenem), G2= Grupo de estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), LI= limite inferior, LS= limite superior, ICr= intervalo de credibilidade.

Figura 4. Representação da quantificação de bactérias no lavado peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP. (A) experimento 1 com n= 4 a 5, (B) experimento 2 com n= 5 a 6 e (C) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo; três experimentos independentes.

7.3 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

Para avaliar a migração de neutrófilos no local da infecção foi quantificado o número total de neutrófilos na cavidade peritoneal, após contagem diferencial, nos camundongos tratados conforme Figura 2. Ocorreu a migração de neutrófilos nos grupos submetidos à CLP em comparação ao grupo naive nos três experimentos (Figura 5). Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos submetidos à CLP (grupo controle *versus* grupo tratado com riboflavina) em nenhum dos experimentos (Figura 5 e Tabela 6).

Tabela 5 - Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo da quantificação de neutrófilos (número neutrófilos x 10⁶) na cavidade peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil Inferior	Mediana	Quartil Superior	Máximo
EXPERIMENTO 1								
G1	4	0	0	0	0	0	0	0
G2	5	0,8	0,56	0,15	0,584	0,7	1,02	1,67
G3	5	1,7	1,62	0,34	0,512	0,7	2,89	3,91
EXPERIMENTO 2								
G1	5	0	0	0	0	0	0	0
G2	6	14,28	8,32	5,74	11,27	12,29	13,69	30,24
G3	6	17,99	6,46	9,84	15,01	17,18	19,60	29,03
EXPERIMENTO 4								
G1	7	0,10	0,07	0,03	0,04	0,10	0,14	0,24
G2	7	7,45	2,75	2,57	6,30	7,27	9,81	10,91
G3	7	5,86	2,49	1,35	4,99	5,93	7,43	9,45

Legenda: G1=naive, G2= Grupo controle (CLP+ertapenem), G3= Grupo de estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), N= número de observações.

Tabela 6 – Comparação da quantificação de neutrófilos (número neutrófilos x 10⁶) na cavidade peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT entre os grupos naive (G1), controle (G2) e tratados com riboflavina (G3), 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP).

Comparações	Diferença entre médias	LI ICr 95%	LS ICr 95%
EXPERIMENTO 1			
G1-G2	*	*	*
G1-G3	*	*	*
G2-G3	0,84	-0,95	2,7
EXPERIMENTO 2			
G1-G2	*	*	*
G1-G3	*	*	*
G2-G3	3,8	-5,98	13,25
EXPERIMENTO 4			
G1-G2	-7,3	-0,974	-5,04
G1-G3	-5,72	-8,2	-3,37
G2-G3	1,57	-0,74	4,26

Legenda: G1= naive, G2= Grupo controle (CLP+ertapenem), G3= Grupo de estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), LI= limite inferior, LS= limite superior, ICr= intervalo de credibilidade, * = não foi possível realizar a análise dos dados, pois um grupo é todo formado por observações iguais a zero. Os intervalos que contém diferença “significativa” entre os grupos, foram marcados em negrito.

Figura 5. Representação do número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT naive e dos grupos submetidos à CLP. (A) experimento 1 com n= 4 a 5, (B) experimento 2 com n= 5 a 6 e (C) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo; três experimentos independentes.

7.4. Avaliação da liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas

A quantificação das concentrações séricas das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α , KC e MIP-2 apresentaram elevação nos grupos submetidos à CLP, em comparação aos naives, nos dois experimentos independentes (Figuras 6, 7, 8 e 9). Não foi possível realizar a análise dos dados para IL-6 e TNF- α no experimento 4, pois o grupo *naive* é todo formado por observações iguais a zero (Tabelas 7 e 8). A comparação entre os camundongos dos grupos de estudo e controle, 12 horas após serem submetidos à CLP, não mostrou diferença significativa das concentrações de citocinas em nenhum dos experimentos realizados (Figuras 6, 7, 8 e 9 e Tabela 8). Assim, neste modelo experimental de indução da sepse, o tratamento com riboflavina 6 horas após o procedimento não promoveu efeito anti-inflamatório sistêmico, considerando as citocinas analisadas.

Tabela 7 – Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo das concentrações séricas de interleucinas IL-6 (ng/mL) e TNF- α (pg/mL), e quimiocinas KC (ng/mL) e MIP-2 (ng/mL) nos camundongos C57BL/6 WT dos grupos naive (G1), controle (G2) e riboflavina (G3), 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP).

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil Inferior	Mediana	Quartil Superior	Máximo	Grupo
EXPERIMENTO 1									
G1	4	IL-6	0,02	0,02	0,00	0,00	0,01	0,03	0,05
		TNF- α	9,41	2,99	25,77	7,00	9,75	11,82	12,36
		KC	0	0	0	0	0	0,01	0,01
		IL-6	2,27	2,75	0,52	0,68	1,48	1,54	7,12

G2	5	TNF- α	42,32	23,42	2,68	46,52	47,50	49,74	65,18
		KC	0,94	0,61	0,32	0,35	0,96	1,39	1,67
		IL-6	16,14	33,27	0,08	0,77	1,85	2,39	75,64
G3	5	TNF- α	30,44	41,80	0	0	0	71,74	80,47
		KC	1,34	0,74	0,61	0,83	1,01	2,04	2,22
EXPERIMENTO 4									
		IL-6	0	0	0	0	0	0	0
G1	7	TNF- α	0	0	0	0	0	0	0
		KC	0,02	0	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03
		MIP-2	0,01	0,01	0	0	0	0,01	0,01
		IL-6	0,74	0,40	0,26	0,34	0,85	1,13	1,28
G2	7	TNF- α	14,97	19,88	0	4,94	6,88	18,02	58,12
		KC	1,10	0,08	1,02	1,02	1,11	1,17	1,19
		MIP-2	0,49	0,28	0,12	0,22	0,40	0,79	0,82
		IL-6	0,78	0,27	0,42	0,44	0,81	1,07	1,08
G3	7	TNF- α	56,85	69,01	0	0	44,47	77,61	200,00
		KC	1,14	0,11	0,99	1,04	1,15	1,24	1,28
		MIP-2	0,84	0,59	0,13	0,29	0,96	1,23	1,73

Legenda: G1= naïve, G2= Grupo controle (CLP+ertapenem), G3= Grupo de estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), IL-6 = interleucina 6, TNF- α = fator de necrose tumoral α , KC = Quimiocina derivada de queratinócitos, MIP-2 = proteína inflamatória de macrófagos-2, N= número de observações.

Tabela 8 – Comparação das concentrações séricas de interleucinas IL-6 (ng/mL) e TNF- α (pg/mL), e quimiocinas KC (ng/mL) e MIP-2 (ng/mL) nos camundongos C57BL/6 WT entre os grupos naïve (G1), controle (G2) e riboflavina (G3), 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP).

Variável	Comparações	Diferença entre médias	LI ICr 95%	LS ICr 95%
EXPERIMENTO 1				
IL-6 soro	G1-G2	-2,45	-34,14	28,95
	G1-G3	-16,18	-43,66	12,88
	G2-G3	-13,72	-41,49	15,36
TNF- α soro	G1-G2	-33,21	-78,26	11,02
	G1-G3	-20,66	-61,98	26,54
	G2-G3	12,54	-25,81	52,72
KC soro	G1-G2	-0,93	-1,74	-0,12
	G1-G3	-1,33	-2,19	-0,47
	G2-G3	-0,4	-1,19	0,38
EXPERIMENTO 4				
IL-6 soro	G1-G2	*	*	*
	G1-G3	*	*	*
	G2-G3	0,03	-0,35	0,44

TNF- α soro	G1-G2	*	*	*
	G1-G3	*	*	*
	G2-G3	41,51	-15,7	99,05
KC soro	G1-G2	-1,08	-1,16	-0,99
	G1-G3	-1,12	-1,2	-1,03
	G2-G3	-0,04	-0,13	0,05
MIP-2 soro	G1-G2	-0,48	-0,91	-0,04
	G1-G3	-0,84	-1,24	-0,42
	G2-G3	-0,35	-0,84	0,06

Legenda: G1= naive, G2= Grupo controle (CLP+ertapenem), G3= Grupo de Estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), IL-6 = interleucina 6, TNF- α = fator de necrose tumoral α , KC = Quimiocina derivada de queratinócitos, MIP-2 = proteína inflamatória de macrófagos-2, LI= limite inferior, LS= limite superior, ICr= intervalo de credibilidade, * = não foi possível realizar a análise dos dados, pois um grupo é todo formado por observações iguais a zero. Os intervalos que contém diferença “significativa” entre os grupos, foram marcados em negrito.

Figura 6. Representação da concentração sérica da interleucina (IL) 6 nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 1 com n= 4 a 5 e (B) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes.

Figura 7. Representação da concentração sérica de fator de necrose tumoral (TNF) α nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 1 com n= 4 a 5 e (B) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes.

Figura 8. Representação da concentração sérica da quimiocina derivada de queratinócito (KC) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 1 com n= 4 a 5 e (B) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes.

Figura 9. Representação da concentração sérica da quimiocina proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-2 nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. N= 7 camundongos/grupo, 1 experimento.

7.5. Avaliação da liberação peritoneal de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas

De forma semelhante ao que ocorreu com relação à análise da liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias, a quantificação das concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α , KC e MIP-2 no lavado peritoneal mostrou elevação nos grupos submetidos à CLP, em comparação aos naives, nos 2 experimentos independentes (Figuras 10, 11, 12 e 13). Não foi possível realizar a análise dos dados, pois o grupo naive é todo formado por observações iguais a zero. A comparação entre os grupos de camundongos 12 horas após serem submetidos à CLP não mostrou diferença significativa das concentrações de citocinas em nenhum dos experimentos realizados (Figuras 10, 11, 12 e 13, e Tabela 10). Não observamos, portanto, redução da inflamação no local da infecção, neste modelo de sepse experimental, nos animais tratados com riboflavina.

Tabela 9 – Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo das concentrações no lavado peritoneal de interleucinas IL-6 (ng/mL) e TNF- α (pg/mL), e quimiocinas KC (ng/mL) e MIP-2 (ng/mL) nos camundongos C57BL/6 WT dos grupos naive (G1), controle (G2) e riboflavina (G3), 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP).

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil Inferior	Mediana	Quartil Superior	Máximo	Grupo
EXPERIMENTO 1									
G1	4	IL-6	0,05	0,05	0,01	0,02	0,03	0,08	0,12
		TNF- α	0	0	0	0	0	0	0
		KC	0	0	0	0	0	0,01	0,01
G2	5	IL-6	6,14	5,63	0,94	2,06	3,31	11,25	13,13
		TNF- α	12,45	6,88	2,26	8,53	15,66	17,35	18,43
		KC	0,31	0,26	0,05	0,12	0,24	0,51	0,65
G3	5	IL-6	11,53	11,01	1,29	2,83	12,07	12,54	28,93
		TNF- α	24,15	33,47	0	0	0	52,97	67,76
		KC	0,43	0,37	0,10	0,15	0,37	0,50	1,01
EXPERIMENTO 4									
G1	7	IL-6	0	0	0	0	0	0	0
		TNF- α	0	0	0	0	0	0	0
		KC	0	0	0	0	0	0	0
		MIP-2	0	0	0	0	0	0	0
G2	7	IL-6	1,37	0,19	1,10	1,24	1,35	1,46	1,70
		TNF- α	101,31	69,97	33,34	53,38	71,48	140,81	239,37
		KC	1,30	0,17	1,01	1,17	1,32	1,39	1,53
		MIP-2	1,38	0,19	1,06	1,22	1,43	1,50	1,62
G3	7	IL-6	1,40	0,22	1,00	1,24	1,46	1,60	1,60
		TNF- α	112,49	93,35	24,43	44,47	95,15	156,68	297,57
		KC	1,36	0,14	1,23	1,24	1,29	1,50	1,55
		MIP-2	1,40	0,35	0,95	1,05	1,57	1,70	1,82

Legenda: G1= naive, G2= Grupo controle (CLP+ertapenem), G3= Grupo de Estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), IL-6 = interleucina 6, TNF- α = fator de necrose tumoral α , KC = Quimiocina derivada de queratinócitos, MIP-2 = proteína inflamatória de macrófagos-2, N= número de observações.

Tabela 10 – Comparação das concentrações no lavado peritoneal de interleucinas IL-6 (ng/mL) e TNF- α (pg/mL), e quimiocinas KC (ng/mL) e MIP-2 (ng/mL) nos camundongos C57BL/6 WT entre os grupos naïve (G1), controle (G2) e riboflavina (G3), 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP).

Variável	Comparações	Diferença entre médias	LI ICr 95%	LS ICr 95%
EXPERIMENTO 1				
IL-6	G1-G2	-6,02	-16,97	4,47
	G1-G3	-11,32	-21,84	-0,25
	G2-G3	-5,3	-15,62	5,74
TNF- α	G1-G2	*	*	*
	G1-G3	*	*	*
	G2-G3	10,8	-27,44	46,74
KC	G1-G2	-0,31	-0,69	0,11
	G1-G3	-0,43	-0,84	-0,03
	G2-G3	-0,12	-0,5	0,25
EXPERIMENTO 4				
IL-6	G1-G2	*	*	*
	G1-G3	*	*	*
	G2-G3	0,04	-0,19	0,27
TNF- α	G1-G2	*	*	*
	G1-G3	*	*	*
	G2-G3	13,05	-79,77	104,9
KC	G1-G2	-1,3	-1,44	-1,16
	G1-G3	-1,36	-1,49	-1,22
	G2-G3	-6,38	-0,2	0,08
MIP-2	G1-G2	*	*	*
	G1-G3	*	*	*
	G2-G3	0,03	-0,31	0,37

Legenda: G1= naïve, G2= Grupo controle (CLP+ertapenem), G3= Grupo de Estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), IL-6 = interleucina 6, TNF- α = fator de necrose tumoral α , KC = Quimiocina derivada de queratinócitos, MIP-2 = proteína inflamatória de macrófagos-2, LI= limite inferior, LS= limite superior, ICr= intervalo de credibilidade, * = não foi possível realizar a análise dos dados, pois um grupo é todo formado por observações iguais a zero. Os intervalos que contém diferença “significativa” entre os grupos, foram marcados em negrito.

Figura 10. Representação da concentração da interleucina (IL) 6 no lavado peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 1 com n= 4 a 5 e (B) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes.

Figura 11. Representação da concentração de fator de necrose tumoral (TNF) α no lavado peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 1 com n= 4 a 5 e (B) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes.

Figura 12. Representação da concentração de quimiocina derivada de queratinócitos (KC) no lavado peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 1 com n= 4 a 5 e (B) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes.

Figura 13. Representação da concentração de quimiocina proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-2 no lavado peritoneal dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. N = 7 camundongos/grupo, 1 experimento.

7.6. Avaliação dos marcadores de disfunção orgânica

Para avaliação da disfunção orgânica nos camundongos C57BL/6 WT submetidos à CLP e tratados, foram analisadas as concentrações séricas de ureia e creatinina para disfunção renal, enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) para disfunção hepática e da isoenzima creatinina quinase-MB (CK-MB) como marcador de disfunção cardíaca. Com relação aos marcadores de disfunção hepática, a concentração sérica de TGO não apresentou diferença significativa na comparação entre os grupos de animais sépticos nos dois experimentos realizados (Figura 14 e Tabelas 11 e 12). Entretanto, na comparação entre os grupos, houve redução significativa da concentração sérica de TGP no grupo dos animais sépticos tratados com riboflavina (Figura15A e Tabelas 11 e 12), mas que não se confirmou em um segundo experimento, em que não ocorreu diferença significativa entre os grupos (Figura15B e Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 – Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo das concentrações séricas dos marcadores de disfunção orgânica TGO (U/mL), TGP (U/mL), CK-MB (U/L), creatinina (mg/dL) e ureia (mg/dL) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

Grupo	N	Variável	Média	DP	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
EXPERIMENTO 3									
G1	6	TGO	176,1	61,00	87,74	136,84	184,64	228,51	235,71
		TGP	30,8	3,37	26,40	28,36	31,29	32,75	35,20
		CK-MB	104,3	20,90	83,99	90,09	96,18	118,54	135,47
		Creatinina	4,19	1,48	3,19	3,54	3,74	3,79	7,18
		Ureia	106,7	28,66	63,84	87,92	115,36	126,84	136,64
G2	6	TGO	176,7	45,64	116,55	149,94	168,93	216,39	230,47
		TGP	24,28	3,12	20,53	21,76	24,44	27,13	27,38
		CK-MB	130,9	32,77	100,25	107,02	123,28	143,60	186,95
		Creatinina	5,30	2,59	3,39	3,61	3,79	7,18	8,97
		Ureia	133,6	43,57	73,92	105,28	134,40	166,04	187,04
EXPERIMENTO 4									
G1	7	TGO	53,33	5,88	43,50	46,40	56,20	57,50	57,80
		TGP	28,58	12,06	15,36	19,99	23,57	33,69	51,50
		CK-MB	110,0	24,68	66,44	88,73	115,14	133,30	135,37
		Creatinina	0,58	0,40	0,12	0,21	0,46	1,06	1,09
		Ureia	112,4	37,64	74,40	79,20	91,60	160,80	162,80
		TGO	56,66	5,18	47,60	53,90	56,70	60,20	63,40
		TGP	26,19	6,52	19,72	20,69	23,39	34,39	34,83

G2	7	CK-MB	202,8	78,08	108,13	134,13	191,91	283,52	325,21
		Creatinina	1,17	0,57	0,54	0,82	0,93	1,65	2,20
		Ureia	177,9	63,07	99,20	119,60	191,60	232,40	270,80

Legenda: G1= Grupo controle (CLP+ertapenem), G2= Grupo de Estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), TGO = Transaminase glutâmico-oxalacética, TGP = Transaminase glutâmico pirúvica, CK-MB= fração MB da creatino quinase, N= número de observações, DP= desvio padrão, Q1= quartil inferior, Q3= quartil superior.

Tabela 12 – Comparação das concentrações séricas dos marcadores de disfunção orgânica TGO (U/mL), TGP (U/mL), CK-MB (U/L), creatinina (mg/dL) e ureia (mg/dL) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

Variável	Comparações	Diferença entre médias	LI ICr 95%	LS ICr 95%
EXPERIMENTO 3				
TGO	G1-G2	0,55	-53,3	54,4
TGP	G1-G2	-6,58	-11,25	-1,98
CK-MB	G1-G2	26,08	-11,22	62,96
Creatinina	G1-G2	1,04	-3,22	5,28
Ureia	G1-G2	26,31	-11,08	63,29
EXPERIMENTO 4				
TGO	G1-G2	-3,24	-10,72	3,98
TGP	G1-G2	2,31	-6,57	11,47
CK-MB	G1-G2	-89,44	-145,1	-30,14
Creatinina	G1-G2	-0,59	-1,14	-0,01
Ureia	G1-G2	-64,98	-114,74	-15,14

Legenda: G1= Grupo controle (CLP+ertapenem), G2= Grupo de Estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), TGO = Transaminase glutâmico oxalacética, TGP = Transaminase glutâmico pirúvica, CK-MB= fração MB da creatino quinase, LI= limite inferior, LS= limite superior, ICr= intervalo de credibilidade. Os intervalos que contém diferença “significativa” entre os grupos, foram marcados em negrito.

Figura 14. Representação da concentração sérica de transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 3 com $n=6$ e (B) experimento 4 com $n=7$ camundongos/grupo, 2 experimentos independentes.

Figura 15. Representação da concentração sérica de transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 3 com $n=6$ e (B) experimento 4 com $n=7$ camundongos/grupo, 2 experimentos independentes. * = diferença significativa entre os grupos.

Com relação à avaliação da disfunção cardíaca, a concentração sérica de CK-MB não apresentou variação significativa na comparação entre os grupos no primeiro experimento (Figura 16A e Tabelas 11 e 12). Porém, no segundo experimento, houve elevação significativa da CK-MB no grupo dos animais sépticos tratados com riboflavina (Figura 16B e Tabelas 11 e 12).

Figura 16. Representação da concentração sérica da fração MB da creatino quinase (CK-MB) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 3 com n= 6 e (B) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes. * = diferença significativa entre os grupos.

De forma semelhante ao ocorrido na comparação entre os grupos de animais sépticos para análise da CK-MB, as concentrações séricas de creatinina e ureia não apresentaram diferença significativa na comparação entre os grupos no primeiro experimento (Tabelas 11 e 12 e Figuras 17A e 18A, respectivamente), mas no segundo, houve elevação destes marcadores de disfunção renal no grupo dos animais submetidos à CLP que receberam tratamento com riboflavina (Figuras 17B e 18B e Tabelas 11 e 12).

Figura 17. Representação da concentração sérica de creatinina nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 3 com n= 6 e (B) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes. * = diferença significativa entre os grupos.

Figura 18. Representação da concentração sérica de ureia nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 3 com n= 6 e (B) experimento 4 com n= 7 camundongos/grupo, 2 experimentos independentes. * = diferença significativa entre os grupos.

7.7. Avaliação das concentrações plasmáticas de lactato

A concentração plasmática de lactato dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP não apresentou diferença significativa na comparação entre os grupos nos experimentos realizados (Tabelas 13 e 14 e Figura 19). Deste modo, não houve redução das concentrações de lactato nos animais sépticos tratados com riboflavina, neste modelo experimental.

Tabela 13 – Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo da concentração plasmática de lactato (mg/dL) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil Inferior	Mediana	Quartil Superior	Máximo
EXPERIMENTO 3								
G1	6	26,94	3,56	20,91	25,34	28,18	29,43	30,15
G2	6	28,18	3,96	23,94	24,92	27,88	30,49	34,09
EXPERIMENTO 4								
G1	7	40,24	11,17	25,49	29,22	45,39	47,25	55,96
G2	7	46,54	9,02	35,44	38,86	47,25	56,27	58,45

Legenda: G1= Grupo controle (CLP+ertapenem), G2= Grupo de Estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), N= número de observações.

Tabela 14 – Comparação das concentrações plasmáticas de lactato (mg/dL) nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

Experimento	Comparações	Diferença entre médias	LI ICr 95%	LS ICr 95%
3	G1-G2	1,28	-3,21	5,95
4	G1-G2	-6,34	-16,3	3,97

Legenda: G1= Grupo controle (CLP+ertapenem), G2= Grupo de estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), LI= limite inferior, LS= limite superior, ICr= intervalo de credibilidade.

A

B

Figura 19. Representação da concentração plasmática de lactato nos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. (A) experimento 3 com $n= 6$ e (B) experimento 4 com $n= 7$ camundongos/grupo; dois experimentos independentes.

7. 8. Avaliação do estresse oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo aos lipídeos no soro dos camundongos C57BL/6 WT submetidos à CLP foi realizada por meio da quantificação da concentração de MDA. Na comparação entre os grupos, os valores das concentrações de MDA 12 horas após o procedimento cirúrgico não apresentaram diferença significativa no experimento realizado (Figura 20 e Tabelas 15 e 16). Assim, não observamos redução do dano oxidativo aos lipídeos nos animais tratados com riboflavina, neste modelo de sepse induzida por CLP.

Tabela 15 – Média, desvio padrão, quartil inferior, mediana, quartil superior e valores mínimo e máximo dos níveis de MDA no soro (mmol/L) dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil Inferior	Mediana	Quartil Superior	Máximo
EXPERIMENTO 5								
G1	5	4,59	0,85	3,30	4,26	4,92	4,98	5,51
G2	5	5,20	0,73	4,34	4,63	5,36	5,51	6,18

Legenda: G1= Grupo controle (CLP+ertapenem), G2= Grupo de estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), N= número de observações, MDA = malondialdeído.

Tabela 16 – Comparação dos níveis de MDA (mmol/L) no soro dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) entre os grupos controle (G1) e tratados com riboflavina (G2).

Experimento	Comparações	Diferença entre médias	LI ICr 95%	LS ICr 95%
5	G1-G2	0,64	-1,25	2,53

Legenda: G1= Grupo controle (CLP+ertapenem), G2= Grupo de estudo (CLP+ertapenem+riboflavina), LI= limite inferior, LS= limite superior, ICr= intervalo de credibilidade, MDA = malondialdeído.

Figura 20. Representação da concentração de malondialdeído (MDA) no soro dos camundongos C57BL/6 WT 12 horas após a CLP nos grupos controle e tratados com riboflavina. N= 5 camundongos/grupo, 1 experimento.

7.9. Avaliação da sobrevida

Foi realizada análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier, e as diferenças estatísticas entre as curvas foram avaliadas utilizando o teste log-rank. Os animais foram tratados conforme descrito no fluxograma 1, monitorados duas vezes por dia e a sobrevida avaliada durante 7 dias nos dois experimentos independentes. Houve um aumento da mortalidade dos animais sépticos que receberam tratamento com riboflavina em comparação com o grupo controle no primeiro experimento (Log-rank $p=0,01$) (Figura 21A). Entretanto, não observamos diferença significativa da mortalidade na comparação entre os grupos de animais sépticos no segundo experimento (Log-rank $p=0,8$) (Figura 21B).

Figura 21. Representação das curvas de Kaplan-Meier para sobrevida dos camundongos C57BL/6 submetidos à CLP. Os animais foram tratados conforme descrito no fluxograma 1 (experimentos 6 e 7), monitorados duas vezes por dia e a sobrevida avaliada durante 7 dias. (A) $n=5$ camundongos/grupo e (B) $n=7$ camundongos/grupo. Diferenças estatísticas entre as curvas avaliadas utilizando o Teste Log-rank. (A) * $p=0,01$ e (B) $p=0,8$.

8 Discussão

A sepse é uma das principais causas de morbidade, mortalidade e utilização de serviços de saúde por crianças em todo o mundo (WEISS et al., 2020). Apesar da crescente compreensão de seus mecanismos fisiopatológicos complexos, permanecem lacunas significativas no conhecimento e não há tratamento específico para a sepse (COOPERSMITH et al., 2018). Assim, no presente estudo, foi utilizado um modelo experimental de ligadura e perfuração do ceco em camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6 (*Wild type*, WT), com o objetivo de avaliar se a administração de riboflavina a camundongos sépticos resultaria em redução da mortalidade, da disfunção orgânica e da carga bacteriana, bem como seus potenciais efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. A análise da sobrevivência mostrou que os animais sépticos que receberam tratamento com riboflavina tiveram mortalidade maior ou semelhante em relação ao grupo controle, nos dois experimentos realizados. Além disso, o tratamento com riboflavina não reduziu ou até mesmo promoveu incremento das concentrações de alguns marcadores de disfunção orgânica como a CK-MB, a ureia e a creatinina, nos animais sépticos. Efeitos anti-inflamatórios da riboflavina também não foram observados, pois não houve diferença significativa nas concentrações das citocinas IL-6, TNF- α , KC e MIP-2 no lavado peritoneal e no sangue, nem no padrão de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e no crescimento bacteriano local e sistêmico, na comparação entre os grupos. Além disso, não foram observados efeitos antioxidantes da riboflavina, já que também não houve diferença entre os grupos na quantificação de MDA, utilizada para avaliação do estresse oxidativo aos lipídeos, ou na concentração plasmática de lactato. Assim como em estudos prévios realizados no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (NASCIMENTO et al., 2010), nossos resultados mostram que houve o desenvolvimento da sepse 12 horas após o procedimento cirúrgico ao comprovarmos o crescimento bacteriano no sangue e o aumento das concentrações séricas das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6, assim como das quimiocinas KC e MIP-2 nos camundongos submetidos a CLP em comparação aos camundongos *naive*. Com relação à avaliação da carga bacteriana, não houve em nosso estudo redução do número de UFC no sangue nem no lavado peritoneal dos camundongos submetidos à CLP que receberam tratamento com riboflavina 6 horas após o procedimento, em comparação aos animais sépticos do grupo controle. Adicionalmente, não observamos crescimento bacteriano no sangue de alguns camundongos nos experimentos realizados, o que pode ser explicado pelo

fato de que culturas positivas podem ser detectadas em apenas 42,2% dos camundongos submetidos à CLP (ZHAI et al., 2018). Nossos achados destoam de uma publicação anterior na qual Toyosawa et al. (2004) mostraram uma redução significativa do número de bactérias no sangue de camundongos que receberam bolus de riboflavina na dose de 20mg/Kg 24 horas antes da inoculação endovenosa da bactéria *Escherichia coli* (TOYOSAWA et al., 2004b). Entretanto, sabe-se que estudos baseados em injeção bacteriana intraperitoneal ou intravenosa necessitam de grandes inóculos devido à incapacidade da maioria das cepas de se multiplicar in vivo e para superar as defesas do hospedeiro, que eliminam eficientemente baixas doses de bactérias (DEITCH, 1998, 2005; CHEN; STANOJCIC; JESCHKE, 2014; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). Os críticos do modelo de injeção bacteriana observam que, como a endotoxemia, ele não imita a condição séptica humana, onde geralmente há um reservatório contínuo para liberação de bactérias (WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980; DEITCH et al., 1998; POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). Neste sentido, o modelo baseado na CLP mostra-se mais adequado, apesar de também apresentar limitações, pois imita a perfuração clínica de apendicite ou de diverticulite, sendo clinicamente mais relevante que os modelos mais simples de sepse por injeção bacteriana em bolus (SONG et al., 2013; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016; BASTARACHE; MATTHAY, 2013).

No presente estudo optamos por realizar a contagem de neutrófilos no lavado peritoneal, pois estas células representam a primeira linha de defesa do hospedeiro através do recrutamento rápido para os locais de infecção, onde fagocitam os agentes patogênicos e produzem mediadores microbicidas, incluindo os radicais livres, apresentando papel primordial no controle da proliferação bacteriana local e de sua disseminação sistêmica (ERMERT; ZYCHLINSKY; URBAN, 2009; BHAN et al., 2016; NOURSHARGH; RENSHAW; IMHOF, 2016; SHEN et al., 2017; CÓLON et al., 2019). Assim, já foi demonstrado que em camundongos submetidos à sepse não grave, o alto número de neutrófilos emigrados para o foco de infecção está associado à redução da carga bacteriana (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; BENJAMIM et al., 2002; CROSARA-ALBERTO et al., 2002; ALVES-FILHO et al., 2006; SPILLER et al., 2019). Assim, nossos resultados referentes ao crescimento bacteriano local e sistêmico estão de acordo com o padrão de migração de neutrófilos, no qual também não observamos diferença significativa na comparação entre o grupo controle e os camundongos sépticos tratados com riboflavina.

Spiller et al. (2019) demonstraram que os neutrófilos de camundongos submetidos à sepse letal têm uma regulação negativa do receptor de quimiocinas CXCR2, o que compromete a rolagem, adesão e migração in vivo, bem como a resposta quimiotática aos agonistas CXCR2 in vitro. Da mesma forma, os neutrófilos circulantes obtidos de pacientes com sepse exibem menor atividade quimiotática do que os neutrófilos de voluntários saudáveis (TAVARES-MURTA et al., 2002; CHISHTI et al., 2004; ARRAES et al., 2006; RAYMOND et al., 2018). É importante ressaltar que a falha na migração de neutrófilos não é causada pela deficiência na produção de fatores quimiotáticos, uma vez que a carga bacteriana maciça é seguida por concentrações aumentadas de citocinas quimiotáticas e quimiocinas no foco da infecção (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; BENJAMIM et al., 2002; CROSARA-ALBERTO et al., 2002; ALVES-FILHO et al., 2006; SPILLER et al., 2019). Uma explicação para a diminuição observada nas habilidades de migração de neutrófilos é que concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias circulantes no início da sepse aumentam os níveis de óxido nítrico induzido, o que pode diminuir a adesão e a transmigração de neutrófilos para locais inflamatórios (ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010; ZHANG et al., 2016). Assim, há evidências na literatura de que a resposta inflamatória sistêmica é o principal mecanismo de falha na migração de neutrófilos na sepse, que por sua vez se correlaciona a uma depuração bacteriana deficiente e alta taxa de mortalidade (ALVES-FILHO et al., 2006; RIOS-SANTOS et al., 2007; ALVES-FILHO et al., 2009; SPILLER et al., 2019). O desenvolvimento da resposta inflamatória é muitas vezes indispensável para combater a infecção com sucesso, no entanto, quando exacerbada, tem um efeito prejudicial no organismo, causando dano tecidual, disfunção de múltiplos órgãos e eventualmente, a morte (DEJAGER et al., 2011; PARK et al., 2016; SÔNEGO et al., 2016). Portanto, uma terapia ótima deve bloquear a superativação do sistema imunológico, mas não impedir a eliminação do patógeno.

Diante do exposto, para avaliar se o tratamento com riboflavina promoveria uma ação anti-inflamatória, com consequente redução dos danos gerados pela resposta desregulada do sistema imune durante a sepse, realizamos a quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e das quimiocinas KC e MIP-2 no soro e no lavado peritoneal dos camundongos sépticos eutanasiados 12 horas após a CLP. Observamos que as concentrações dos mediadores inflamatórios foram semelhantes entre os grupos tanto no soro quanto no lavado peritoneal, ou seja, a riboflavina não promoveu ação anti-inflamatória local ou sistêmica. Esse achado está de acordo com o padrão de migração de neutrófilos do presente estudo, pois as

quimiocinas KC e MIP-2 desempenham um papel importante no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, sendo consideradas homólogas funcionais da IL-8 em camundongos (LUSTER, 1998; SÔNEGO et al., 2016; WU et al., 2016; DAVID et al., 2017). Realizamos a quantificação da concentração sérica da MIP-2 e não apenas no lavado peritoneal, pois existem evidências na literatura de que esta quimiocina, em modelo murino de peritonite séptica, apresenta aumento expressivo no soro, lavado peritoneal e homogenato de pulmão em comparação com outras quimiocinas (WALLEY et al., 1997).

Em termos de efeito anti-inflamatório, portanto, a riboflavina não promoveu os mesmos benefícios observados em estudos prévios, baseados em modelo de choque endotóxico induzido por LPS (*Escherichia coli*) (TOYOSAWA et al., 2004a, 2004b; KODAMA et al., 2005). Toyosawa et al (2004) demonstraram redução nas concentrações de IL-6, TNF- α e MIP-2 no plasma dos camundongos 12 horas após administração de LPS no grupo tratado com riboflavina na dose de 20mg/Kg 6 horas após a injeção (TOYOSAWA et al., 2004a). Seguindo a mesma metodologia, Kodama et al (2005) também observaram redução nas concentrações plasmáticas de IL-6 e MIP-2 9 e 12 horas após administração de LPS no grupo tratado com riboflavina. Essa discrepância aparente nos resultados pode ser decorrente das diferenças importantes inerentes aos modelos experimentais, no nível molecular (LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). Estudos anteriores comparando modelos de sepse induzida por CLP e por injeção de LPS mostram que as citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , e as quimiocinas KC e MIP-2 têm perfis temporais diferentes, ou seja, as citocinas atingem o pico mais cedo, em maiores concentrações e por períodos mais curtos na endotoxemia. Portanto, a resposta inflamatória após injeção de LPS tem caráter robusto e transitório, muito diferente da liberação mais suave e prolongada das citocinas em modelos de CLP (REMICK et al., 2000; REMICK; WARD, 2005; MERA et al., 2011; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016; LIBERT et al., 2019). Na inoculação de bactérias, as respostas observadas de citocinas são mais semelhantes aos modelos de injeção de LPS (DEITCH et al., 1998). Além disso, a magnitude da resposta do hospedeiro observada nesses modelos depende da via de administração das bactérias, com a via intraperitoneal mostrando respostas inflamatórias atenuadas em comparação com a via intravenosa (CHEN; STANOJCIC; JESCHKE, 2014; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). Pacientes com sepse apresentam elevação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , com valores mais baixos e curso mais prolongado em comparação com a endotoxemia, que se caracteriza pela elevação acentuada e rápida dessas citocinas. Assim, embora esses modelos possam

mimetizar de alguma forma o processo de sepse, eles não reproduzem a complexidade clínica completa e a heterogeneidade intrínseca dos pacientes (DEJAGER et al., 2011). Há evidências que demonstram claramente que a administração de LPS não deve ser aceita como um modelo relevante de sepse, dadas as muitas diferenças entre o fenótipo de sepse e aquele induzido pela injeção de LPS (LIBERT et al., 2019).

Acreditamos que a escolha do intervalo de tempo de 12 horas para coleta dos materiais para análise da resposta inflamatória seja adequada, pois Li et al. (2018) demonstraram que as concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , e da quimiocina MIP-2 aumentaram significativamente nos camundongos 8h após a CLP, evoluindo com redução posterior, mas às 48 horas ainda permaneciam superiores às concentrações observadas às 0 h (LI et al., 2018). Segundo Gong e Wen (2019), após a indução da peritonite por CLP, citocinas/quimiocinas inflamatórias como IL-10, TNF- α , CCL2 e CCL3 são rapidamente induzidas na cavidade peritoneal (resposta local), sangue e órgãos periféricos (resposta sistêmica) em 4 horas, com pico em 24 horas, retornando três dias depois às concentrações basais, indicando o final da fase aguda da sepse (GONG; WEN, 2019). Adicionalmente, de acordo com relatos anteriores, os camundongos submetidos à CLP parecem normais por aproximadamente 10 horas e começam a mostrar sinais clínicos de sepse cerca de 12 horas após o procedimento (ZHAI et al., 2018). Em pacientes sépticos, as concentrações circulantes de IL-6, IL-8 e TNF- α apresentaram pico em menos de 12 horas e estavam significativamente aumentadas em três momentos (< 12 horas, 4 dias e 14 dias após a sepse) em comparação com indivíduos saudáveis (RAYMOND et al., 2018).

Sanches et al. (2014) mostraram que a riboflavina exerce potentes efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios no fígado isquêmico, protegendo as células do parênquima hepático contra lesões de isquemia-reperfusão. Assim, considerando que a administração de oxigênio faz parte do tratamento de pacientes sépticos e que existem evidências de que a sepse leva ao acúmulo de succinato, uma assinatura metabólica universal da isquemia, esta se torna uma condição que imita o mecanismo de isquemia-reperfusão (TANNAHILL et al., 2013; CHOUCANI et al., 2014). Entretanto, observamos uma redução significativa da concentração sérica de TGP no grupo dos animais sépticos tratados com riboflavina somente em um dos experimentos, o que não se confirmou posteriormente e as concentrações séricas de TGO foram semelhantes entre os grupos em ambos os experimentos.

Também não houve diferença significativa das concentrações de ureia, creatinina e da isoenzima CK-MB na comparação entre os grupos no primeiro experimento. Entretanto,

observamos elevação significativa destes biomarcadores no grupo de animais sépticos tratados com riboflavina em um segundo experimento. Acreditamos que essa discrepância possa ter sido influenciada pelos diferentes graus de gravidade da sepse que podem ser induzidos pela CLP (DEJAGER et al., 2011). Além disso, uma diferença metodológica entre os dois experimentos foi a utilização do isoflurano a 2% em um deles para infusão da riboflavina ou do placebo, 6 horas após a CLP, e como qualquer outro medicamento, o isoflurano não é isento de efeitos colaterais. Embora alguns grupos observaram proteção contra lesões renais e hepáticas com o uso de anestésicos voláteis (LEE et al., 2007; HERRMANN et al., 2013; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016), no presente estudo observamos concentrações mais elevadas de ureia e creatinina no experimento em que os camundongos foram submetidos à anestesia com isoflurano.

Apesar de a disfunção orgânica constituir ponto crucial na fisiopatologia da sepse, por contribuir para sua alta taxa de mortalidade, ainda não há em estudos pré-clínicos painel validado e padronizado de marcadores semelhantes ao SOFA, e muitos dos artigos mais citados sobre sepse baseados em estudos de modelos animais não realizaram avaliação da disfunção orgânica, o que dificulta a comparabilidade dos estudos (LIBERT et al., 2019). No presente estudo, as concentrações dos marcadores de disfunção orgânica foram avaliadas 12 horas após a CLP, pois a disfunção orgânica ocorre geralmente de 6 a 12 horas após a indução da sepse, sendo causada, principalmente, pela resposta inflamatória sistêmica (ANGUS; VAN DER POLL, 2013; RHODES et al., 2017; SONG; ZOU; CAO, 2018). Estudos prévios mostram que seria possível detectar alterações 12 horas após a indução da sepse com este modelo experimental. Li et al. (2018) analisaram o padrão da disfunção hepática e renal ao longo das horas, por meio de testes bioquímicos no sangue, em modelo de sepse induzida por CLP. Com relação à função hepática, tanto a TGO quanto a TGP aumentaram significativamente 8 horas após a CLP e mantiveram-se elevadas durante todo o período de observação (48 h). De forma semelhante, observou-se aumento das concentrações séricas de ureia e creatinina 8 horas após a CLP, com concentrações significativamente mais elevadas após 16 h e retorno gradual ao normal, 48 horas após o procedimento cirúrgico (LI et al., 2018). Adicionalmente, Liu et al. mostraram aumento significativo das concentrações séricas de CK-MB no grupo CLP em comparação com o grupo *sham* 12 horas após a indução da sepse, utilizando modelo experimental semelhante ao utilizado em nosso estudo (LIU et al., 2019).

Embora o sistema imunológico do hospedeiro tenha ações geralmente benéficas, resposta imune excessiva e desregulada pode causar lesões graves e contribuir para a falência de órgãos (ROSSAINT; ZARBOCK, 2015). Assim, considerando que a resposta inflamatória é um dos mecanismos que contribuem para a lesão orgânica (STELING et al., 2013; DELLINGER, 2013; GARCIA-ALVAREZ; MARIK; BELLOMO, 2014), o fato de o tratamento com riboflavina não ter resultado em redução das concentrações de mediadores pró-inflamatórios nos camundongos sépticos poderia justificar, em parte, a ausência de melhora da maioria dos marcadores de disfunção orgânica.

Tem sido consistentemente demonstrado que, durante a sepse, a insuficiência energética celular relacionada à disfunção mitocondrial, decorrente do estresse oxidativo, está associada a um pior prognóstico nos pacientes graves (BREALEY et al., 2002; SVISTUNENKO et al., 2006; CARRÉ et al., 2010; KOZLOV et al., 2011; SINGER, 2014), e a melhora da biogênese da mitocôndria melhora a sobrevivência dos pacientes (CARRÉ et al., 2010). Em condições normais, as mitocôndrias são protegidas dos danos causados pelas ROS por vários sistemas antioxidantes que interagem entre si. No entanto, quando a proteção antioxidante é sobrecarregada, o estresse oxidativo inicia danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios nas mitocôndrias, resultando na perda da função enzimática na cadeia transportadora de elétrons e, eventualmente, disfunção mitocondrial e prejuízo na produção de ATP (JAMES; MURPHY, 2002; TURRENS, 2003; GALLEY, 2010). Como a quantificação direta in vivo de ROS é difícil em virtude de sua instabilidade química e meia-vida muito curta, as medidas de estresse oxidativo têm-se baseado na quantificação de subprodutos da oxidação de macromoléculas (MANSO et al., 2013; WEISS; DEUTSCHMAN, 2014). Neste sentido, a peroxidação lipídica é utilizada como parâmetro de medida indireta do estresse oxidativo aos lipídios no plasma (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Assim, optamos por realizar a quantificação do MDA, um produto final formado durante a degradação dos fosfolipídios da membrana celular em decorrência do estresse oxidativo, usado amplamente como biomarcador da oxidação lipídica há mais de 30 anos (LORENTE et al., 2013; TSIKAS, 2017). Contudo, não observamos redução dos níveis de MDA nos animais sépticos que receberam riboflavina, sugerindo que este medicamento não promoveu o efeito antioxidante esperado. Uma possível explicação seria o fato de que o medicamento possa não ter atingido as mitocôndrias na quantidade suficiente para promover algum benefício, visto que o efeito desejado de um medicamento ou gene direcionado às mitocôndrias pode ser

alcançado apenas se a molécula bioativa for absorvida pelo órgão ou célula alvo ou por ambos e se acumular no local subcelular desejado (neste caso, as mitocôndrias) (GALLEY, 2010).

Sabemos que, juntamente com a inflamação, o estresse oxidativo está envolvido nas vias ativadas durante a sepse que levam à disfunção orgânica e à morte. Em recém-nascidos sépticos, há aumento significativo das concentrações circulantes de TNF- α e MDA, em comparação com controles saudáveis (SEEMA et al., 1999; BATRA et al., 2000; POGGI; DANI, 2018). Além disso, o estresse oxidativo na mitocôndria parece desempenhar um papel na redução da capacidade respiratória dos tecidos gravemente afetados, pelo desacoplamento parcial da fosforilação oxidativa mitocondrial, levando a baixos níveis de ATP intracelular e a concentrações aumentadas de lactato (CROUSER, 2002, 2004; CARRÉ et al., 2010; PRAUCHNER, 2017). Considerando essa relação entre resposta inflamatória, estresse oxidativo e concentrações de lactato na sepse, observamos que, no presente estudo, o tratamento com riboflavina não resultou em redução dos mediadores pró-inflamatórios nem do estresse oxidativo, pela análise da peroxidação lipídica e também não houve redução das concentrações de lactato nos animais sépticos.

Na sepse, a elevação das concentrações de lactato é um reflexo da disfunção celular, embora se reconheça que vários fatores como metabolismo anaeróbico na hipoperfusão tecidual, respiração aeróbica prejudicada, glicólise aeróbica acelerada e redução da depuração hepática, também contribuem (SCOTT et al., 2017; ZHAI et al., 2018). Adicionalmente, uma característica da sepse é o início precoce da disfunção microcirculatória, que surge como parte da resposta inflamatória sistêmica, gerando aumento concomitante das concentrações de lactato com a diminuição da perfusão tecidual (BAKKER, 2016; SUETRONG; WALLEY, 2016; ZHAI et al., 2018).

Nesse contexto, o lactato sérico é tipicamente usado para avaliar a gravidade da doença, a resposta ao tratamento e o prognóstico (SUETRONG; WALLEY, 2016). As diretrizes recentes da Sepsis-3 recomendam que a persistência de lactato sérico acima de 2 mmol/L, apesar da ressuscitação hídrica adequada, seja incluída como um novo critério quando se define clinicamente o choque séptico (SINGER et al., 2016). Essa recomendação baseia-se no reconhecimento de que há correlação fortemente positiva entre as concentrações de lactato e a gravidade e a morbimortalidade da doença no contexto da sepse (NICHOL et al., 2010; RISHU et al., 2013; NOLT et al., 2018). Assim, como a medida das concentrações de lactato é frequentemente incorporada no manejo clínico da doença crítica, particularmente em casos de sepse e choque séptico (NOLT et al., 2018), optamos por realizar a quantificação

da concentração plasmática do lactato para avaliar se o uso da riboflavina promoveria sua redução nos animais sépticos. A coleta de sangue para análise foi realizada 12 horas após a CLP, pois estudos anteriores mostraram que o lactato sanguíneo aumenta no estágio inicial e depois diminui em modelos animais e humanos (SOLLER et al., 2015; LI et al., 2018). Essas alterações na cinética do lactato sanguíneo foram claramente significativas após 6 horas em muitos estudos e após 12 horas na maioria (VINCENT et al., 2016). Entretanto, de acordo com nossos resultados, os camundongos sépticos tratados com riboflavina não apresentaram redução das concentrações plasmáticas de lactato em comparação ao grupo controle.

No presente estudo, realizamos 2 experimentos independentes de sobrevida para avaliar se a riboflavina promove redução da mortalidade nos camundongos submetidos à CLP. Porém, observamos que houve um aumento da mortalidade dos animais sépticos que receberam tratamento com riboflavina em comparação com o grupo controle no primeiro experimento e não houve diferença entre os grupos no segundo. Ou seja, o tratamento com riboflavina não resultou em melhora da sobrevida ou aumentou a mortalidade dos camundongos sépticos, o que está de acordo com os achados dos marcadores de disfunção orgânica, discutidos anteriormente. Contudo, devemos ponderar que o aumento da mortalidade pode ter sido secundário a diferenças na gravidade da sepse induzida pelo modelo de CLP e ao pequeno número de observações do experimento. Estes resultados divergem de estudos anteriores, em que Toyosawa e colaboradores demonstraram aumento da sobrevida em camundongos que foram tratados com riboflavina sob a forma de bolus ou infusão contínua após indução de choque endotóxico por LPS (*Escherichia coli*), ou como pré-tratamento, 24 horas antes da infecção induzida por infusão da bactéria *Escherichia coli*, não havendo relato de uso de antibiótico na metodologia dos estudos (TOYOSAWA et al., 2004a, 2004b). Entretanto, devemos ser cautelosos ao comparar pesquisas realizadas a partir de metodologias muito diferentes. Em 2017, foi realizada a conferência Wiggers-Bernard que propôs as diretrizes definidas como “*Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies*” (OSUCHOWSKI et al., 2018), recomendando, dentre outras orientações, que as intervenções terapêuticas devam ser iniciadas após o insulto séptico, replicando os cuidados clínicos, com tratamento randomizado e cego, quando viável. Também preconiza que o seguimento da sobrevida deve refletir razoavelmente o curso clínico temporal do modelo de sepse e, com relação aos tipos de infecção, que a injeção de LPS não é um modelo apropriado para replicação da sepse humana (OSUCHOWSKI et al., 2018). Deste modo, o contraste entre os resultados apresentados e os estudos que obtiveram resultados favoráveis com o uso da

riboflavina (TOYOSAWA et al., 2004a, 2004b; KODAMA et al., 2005) provavelmente ocorreu pelo fato de o choque endotóxico induzido por LPS e a injeção de bactérias serem considerados modelos que não contemplam a complexidade da sepse (RUIZ et al., 2016; SONG; ZOU; CAO, 2018).

O modelo CLP é considerado o padrão-ouro para estudos de sepse, mimetizando o curso clínico da sepse intra-abdominal (STARR et al., 2014; SONG; ZOU; CAO, 2018). Contudo, ainda há alguns problemas difíceis de serem resolvidos e que afetam o prognóstico dos camundongos, como volume de fezes que vaza para a cavidade abdominal, e o fato de os focos de infecção serem facilmente envolvidos pelo omento e pelo tecido circundante (MAIER et al., 2004; POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008; SONG; ZOU; CAO, 2018). Embora os procedimentos cirúrgicos padronizados sejam realizados para facilitar um resultado consistente de CLP, um efeito individual variável pode ser observado mesmo em animais que inicialmente recebem insultos idênticos (RAVEN, 2012). Pesquisa realizada por Zhai et al. (2018) mostrou que 40% dos animais exibiram apenas um pequeno distúrbio fisiológico e a autópsia confirmou a formação de abscesso intra-abdominal localizado que foi bem tolerado pelos camundongos. De fato, estudos mostram que certa proporção de animais submetidos a insultos de CLP isolou com sucesso a área infectada pela formação de abscesso local, raramente desenvolvendo sepse e sobrevivendo em longo prazo (KIM, H. et al., 2013; WANG et al., 2015; ZHAI et al., 2018). No entanto, não sabemos se esta foi uma das justificativas para a diferença de resultados entre os experimentos do presente estudo, pois não realizamos necropsia dos camundongos.

Algumas limitações potenciais deste trabalho incluem o fato de o estudo, apesar de aleatorizado, não ter sido cego. Além disso, contamos com o modelo de CLP porque mimetiza as respostas inflamatórias, hemodinâmicas e metabólicas observadas na sepse humana originária do compartimento abdominal. No entanto, a variabilidade inerente persiste neste modelo devido a diferenças incontrolláveis em animais e operadores. As fontes de variabilidade incluem, mas não se limitam ao comprimento das lesões associadas, o tamanho e o número de punções criadas, a quantidade de fezes extravasadas da cecotomia, a escolha anestésica, a inclusão de antibióticos e, em caso afirmativo, qual medicamento e regime, o tempo e volume de ressuscitação de fluidos após a CLP, a habilidade cirúrgica individual de cada operador em relação ao tempo de operação e a quantidade de trauma tecidual (HUBBARD et al., 2005; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016). Além disso, a CLP não pode garantir um vazamento constante do conteúdo fecal (GONNERT et al., 2011). Outra

questão foi o uso de intervalos de tempo fixos após o insulto séptico para a administração do antibiótico e da terapia em teste, no caso a riboflavina. Adicionalmente, realizamos a coleta de material para análises de crescimento bacteriano, citocinas inflamatórias, marcadores de disfunção orgânica, lactato e MDA apenas em um ponto de tempo de 12 horas após o procedimento cirúrgico. Isso é problemático, já que os seres humanos não têm a mesma magnitude de resposta nem o mesmo tempo de resposta imune ao insulto séptico, mesmo que a intensidade do insulto seja mantida constante (REMICK et al., 2002; RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016; LEWIS et al., 2016).

Apesar das possíveis limitações acima referidas e de o tratamento com riboflavina, no modelo de sepse induzida por CLP, não ter mostrado os benefícios esperados e, em alguns experimentos, ter se apresentado inclusive prejudicial, a importância do presente estudo reside no fato de termos mostrado que o uso da riboflavina na sepse não promove as melhorias relatadas em outros estudos baseados em modelos de LPS e injeção de bactérias. Essas diferenças também já ocorreram, por exemplo, em ensaios clínicos de inibidores do TNF- α , que inicialmente mostraram uma proteção impressionante e, portanto, uma grande promessa terapêutica quando testados em modelos murinos de LPS. Infelizmente, estudos clínicos posteriores em humanos falharam em mostrar qualquer benefício na taxa de mortalidade, o que poderia ter sido previsto a partir de modelos murinos de sepse induzida por CLP, que demonstraram, similarmente, redução da sobrevida (REMICK et al., 1995; REMICK; WARD, 2005; RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007; LEWIS; BILLIAR; ROSENGART, 2016).

9 Conclusão

O presente estudo mostra que o uso de riboflavina associada ao tratamento antimicrobiano não reduziu a mortalidade em modelo experimental de sepse induzida por CLP. Além disso, o tratamento com riboflavina não reduziu ou até mesmo promoveu aumento das concentrações de alguns marcadores de disfunção orgânica como a CK-MB, a ureia e a creatinina, e não foram observados efeitos anti-inflamatórios nem antioxidantes da riboflavina nos animais sépticos.

10 Referências

ALVES-FILHO, J. C. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 2, p. 461–470, 2 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16424729>>.

ALVES-FILHO, J. C. et al. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 10, p. 4018–4023, 3 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234125>>.

ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock**, v. 34, n. 7, p. 15–21, 1 2010. Disponível em: <<https://journals.lww.com/shockjournal/Pages/articleviewer.aspx?year=2010&issue=09001&article=00003&type=Fulltext>>.

AMES, S. G. et al. Hospital variation in risk-adjusted pediatric sepsis mortality. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 19, n. 5, p. 390–396, 5 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29461429>>.

AN, R. et al. Melatonin attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a PI3K/Akt-dependent mechanism. **Basic Research in Cardiology**, v. 111, n. 8, p. 1–15, 12 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00395-015-0526-1>>.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–1310, 7 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11445675>>.

ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 840–851, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23984731>>.

ANTHONYMUTHU, T. S.; KIM-CAMPBELL, N.; BAYIR, H. Oxidative lipidomics: applications in critical care Tamil. **Current Opinion in Critical Care**, v. 23, n. 4, p. 251–256, 8 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5553634>>.

ARAKI, S. et al. Enhancement of resistance to bacterial infection in mice by vitamin B2. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 4, p. 599–602, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1292/jvms.57.599>>.

ARRAES, S. M. A. et al. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2906–2913, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024638>>.

ARTS, R. J. et al. Cellular metabolism of myeloid cells in sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 1, p. 151–164, 1 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27272310>>.

ARULKUMARAN, N. et al. Mitochondrial function in sepsis. **Shock**, v. 45, n. 3, p. 271–281,

3 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755359>>.

ASHOORI, M.; SAEDISOMEOLIA, A. Riboflavin (vitamin B₂) and oxidative stress: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 11, p. 1985-1991, 6 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24650639>>.

ASTIZ, M. E. et al. Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 23, n. 2, p. 265-271, 2 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7867351>>.

BAJČETIĆ, M.; SPASIĆ, S.; SPASOJEVIĆ, I. Redox therapy in neonatal sepsis: reasons, targets, strategy, and agents. **Shock**, v. 42, n. 3, p. 179-184, 9 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24827393>>.

BAKER, C. C. et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**, v. 94, n. 2, p. 331-335, 8 1983. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6879447>>.

BAKKER, J. Lactate levels and hemodynamic coherence in acute circulatory failure. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 30, n. 4, p. 523-530, 12 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpa.2016.11.001>>.

BALAMUTH, F. et al. Pediatric severe sepsis in U.S. children's hospitals. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 15, n. 9, p. 798-805, 11 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4221502>>.

BAR-EVEN, A. et al. Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 6, p. 509-517, 5 2012. PMID: 22596202. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22596202>>.

BAR-OR, D. et al. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: Are there clues to better treatment? **Redox Report**, v. 20, n. 5, p. 193-197, 9 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25803628>>.

BASTARACHE, J.; MATTHAY, A. M. Cecal-Ligation Model of Sepsis in Mice: New Insights. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 1, p. 356-357, 1 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3734801>>.

BATRA, S. et al. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. **Annals of Tropical Paediatrics International Child Health**, v. 20, n. 1, p. 27-33, 3 2000. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/12494289>>.

BENJAMIM, C. F. et al. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3602-3610, 7 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC128083>>.

BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. D. Q. Role of Nitric Oxide in the Failure of Neutrophil Migration in Sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 1, p. 214-223, 7 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882600>>.

BETZ, A. L. et al. Riboflavin reduces edema in focal cerebral ischemia. **Acta Neurochirurgica Supplement (Wien)**, v. 60, p. 314-317, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7976577>>.

BHAN, C. et al. Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis. **Inflammation Research**, v. 65, n. 11, p. 853-868, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00011-016-0970-x.pdf>>.

BOUMA, G. et al. Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. **British Journal of Haematology**, v. 151, n. 4, p. 312-326, 8 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20813010>>.

BREALEY, D. et al. Association Between Mitochondrial Dysfunction and Severity and Outcome of Septic Shock. **Lancet**, v. 360, n. 9328, p. 219-223, 7 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12133657>>.

BREALEY, D. et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 3, p. R491-497, 3 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14604843>>.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 3 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15001782>>.

BROOKS, G. A.. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 757-785, 4 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29617642>>.

BROWN, K. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 157-169, 7 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16829300>>.

BULLOCK, B.; BENHAM, M. Bacterial sepsis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537054>>. Acesso em: 10 Fev. 2020.

CARCHMAN, E. H. et al. Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against hepatocyte cell death and hepatic injury from infection/sepsis in mice. **Hepatology**, v. 53, n. 6, p. 2053-2062, 5 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21437926>>.

CARRÉ, J. E. et al. Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 6, p. 745-751, 9 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949402>>.

CASSERLY, B. et al. Lactate measurements in sepsis-induced tissue hypoperfusion: results from the Surviving Sepsis Campaign database. **Critical Care Medicine**, v. 43, n. 3, p. 567-573, 3 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25479113>>.

CECCONI, M. et al. Sepsis and septic shock. **The Lancet**, v. 392, n. 10141, p. 75–87, 7 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30696-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30696-2)>.

CHALUPKA, A. N.; TALMOR, D. The Economics of Sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 28, n. 1, p. 57–76, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2011.09.003>>.

CHASTAIN, J. L.; MCCORMICK, D. B. Clarification and quantitation of primary (tissue) and secondary (microbial) catabolites of riboflavin that are excreted in mammalian (rat) urine. **Journal of Nutrition**, v. 117, n. 3, p. 468-75, 3 1987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3572560>>.

CHEN, P.; STANOJCIC, M.; JESCHKE, M. G. Differences between murine and human sepsis. **Surgical Clinics of North America**, n. 94, p. 1135-1149, 2014. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/266148194>>.

CHENG, S. C. et al. Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. **Nature Immunology**, v. 17, n. 4, p. 406-413, 4 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26950237>>.

CHISHTI, A. D. et al. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. **Intensive Care Medicine**, v. 30, n. 4, p. 605-611, 4 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14991094>>.

CHOUCHANI, E. T. et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. **Nature**, v. 515, n. 7527, p. 431–435, 11 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4255242/pdf/emss-60548.pdf>>.

COLÓN, D. F. et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 23, n. 113, p. 1–13, 4 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13054-019-2407-8>>.

COOPERSMITH, C. M. et al. Surviving sepsis campaign: Research priorities for sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 8, p. 1334–1356, 8 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29957716>>.

CRACIUN, F. L. et al. Early murine polymicrobial sepsis predominantly causes renal injury. **Shock**, v. 41, n. 2, p. 97–103, 2 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5547441/pdf/nihms883406.pdf>>.

CROSARA-ALBERTO, D. P. et al. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by Staphylococcus aureus. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 5, p. 645–658, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1573390>>.

CROUSER, E. D. et al. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 2, p. 276-284, 2 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11889292>>.

CROUSER, E. D. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. **Mitochondrion**, v. 4, n. 5- 6 SPEC. ISS., p. 729–741, 9 2004. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120428>>.

CUNHA, F. Q. et al. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF-alpha and IL-1-beta. **Immunology**, v. 81, n. 2, p. 211–5, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512527>>.

CVETKOVIC, M. et al. Timing of Death in Children Referred for Intensive Care with Severe Sepsis: Implications for Interventional Studies. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 16, n. 5, p. 410–417, 6 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25739013>>.

DAVID, J. et al. Suppression of methylmercury-induced MIP-2 expression by N-acetyl-l-cysteine in murine RAW264.7 macrophage cell line. **European Journal of Medical Research**, v. 22, n. 1, p. 1–8, 11 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29122013>>.

DAVIS, A. L. et al. American College of Critical Care Medicine clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 45, n. 6, p. 1061–1093, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28509730>>.

DE BACKER, D. et al. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. **Annals of Intensive Care**, v. 1, n. 1, p. 27, 7 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224481>>.

DE BACKER, D. et al. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 73–79, 1 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916386>>.

DE LA RICA, A. S.; GILSANZ, F.; MASEDA, E. Epidemiologic trends of sepsis in western countries. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 17, p. 4–9, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5050194/pdf/atm-04-17-325.pdf>>.

DEITCH, E. A. et al. Animal Models of Sepsis and Shock: A Review and Lessons Learned, **Shock**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 1 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9466467>>.

DEITCH, E. A. Rodent models of intra-abdominal infection. **Shock**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. 19–23, 12 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16374368>>.

DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, 4 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.001>>.

DELLINGER, R. P. The Surviving Sepsis Campaign: 2013 and beyond. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n. 10, p. 1803-1805, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23673089>>.

DENG, D. et al. Systematic investigation on the turning point of over-inflammation to immunosuppression in CLP mice model and their characteristics. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 49–58, 1 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.11.011>>.

DEUTSCHMAN, C. S. et al. Sepsis-induced cholestasis, steatosis, hepatocellular injury, and impaired hepatocellular regeneration are enhanced in interleukin-6 $-/-$ mice. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 10, p. 2613–2620, 10 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16932236>>.

DEUTSCHMAN, C. S.; TRACEY, K. J. Sepsis: Current dogma and new perspectives. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 463–475, 4 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24745331>>.

DEWI, R. et al. Pediatric logistic organ dysfunction-2 (PELOD-2) score as a model for predicting mortality in pediatric burn injury. **Annals of Burns and Fire Disasters**, v. 32, n. 2, p. 135–142, 6 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6733216>>.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, v. 112, n. 6 SUPPL., p. 321S-329S, 12 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9400897>>.

DOI, K. et al. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 10, p. 2868–2878, 10 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2752080/pdf/JCI39421.pdf>>.

EL-GAMAL, M. I. et al. Recent updates of carbapenem antibiotics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017; 131:185-195. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.022>>.

ERMERT, D.; ZYCHLINSKY, A.; URBAN, C. Fungal and Bacterial Killing by Neutrophils. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, N. J.), v. 470, p.293-312, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19089391>>.

EVANS, I. V. R. et al. Association between the New York sepsis care mandate and in-hospital mortality for pediatric sepsis. **JAMA**, v. 320, n. 4, p. 358–367, 7 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6500448>>.

FANG, H. et al. Balancing innate immunity and inflammatory state via modulation of neutrophil function: A novel strategy to fight sepsis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 187048, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26798659>>.

FERREIRA, F. L. et al. Serial Evaluation of the SOFA Score to Predict Outcome in Critically Ill Patients. **JAMA**, v. 286, n. 14, p. 1754–1758, 10 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11594901>>.

FERREIRA, A. E. et al. PPAR- γ /IL-10 Axis Inhibits MyD88 Expression and Ameliorates Murine Polymicrobial Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 5, p. 2357–2365, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24489087>>.

FILHO, R. R. et al. Blood Lactate Levels Cutoff and Mortality Prediction in Sepsis-Time for a Reappraisal? A Retrospective Cohort Study. **Shock**, v. 46, n. 5, p. 480-485, 11 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27380535>>.

FLEISCHMANN, C. et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 3, p. 259-272, 2 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26414292>>.

FLEISCHMANN-STRUZEK, C. et al. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 6, n. 3, p. 223-230, 3 2018. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30063-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30063-8)>.

FRANK, M. et al. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 12, p. 2297-2310, 8 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.08.007>>.

FUNK, D. J.; PARRILLO, J. E.; KUMAR, A. Sepsis and Septic Shock: A History. **Critical Care Clinics**, v. 25, n. 1, p. 83-101, 1 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.003>>.

GAIESKI, D. F. et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the united states. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 5, p. 1167-1174, 5 2013. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23442987>>.

GALLAGHER, M. L. **Krause's Food & the Nutrition Care Process**. 13. Ed. St Louis, MO: Elsevier/Saunders, 2012.

GALLEY, H. F. Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. **Critical Care**, v. 14, n. 4, p. 230, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804578>>.

GARCIA-ALVAREZ, M.; MARIK, P.; BELLOMO, R. Sepsis-associated hyperlactatemia. **Critical Care**, v. 18, n. 5, p. 503, 9 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25394679>>.

GIOVANNINI, I. et al. Respiratory Quotient and Patterns of Substrate Utilization in Human Sepsis and Trauma. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 226-230, 5 1983. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6408272>>.

GOLDMAN, D.; BATEMAN, R. M.; ELLIS, C. G. Effect of decreased O2 supply on skeletal muscle oxygenation and O2 consumption during sepsis: Role of heterogeneous capillary spacing and blood flow. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 6, p. H2277-2285, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16399873>>.

GOLDSTEIN, B. et al. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15636651>>.

GÓMEZ, H.; KELLUM, J. A. Sepsis-induced acute kidney injury. **Current Opinion in Critical Care**, v. 22, n. 6, p. 546-553, 12 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5654474>>.

GONG, W.; WEN, H. Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. **Methods in Molecular Biology**, v. 1960, p. 249-255, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30798538>>.

GONNERT, F. A. et al. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. **Journal of Surgical Research**, v. 170, n. 1, p. e123–e134, 9 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21737102>>.

GOTTS, J. E.; MATTHAY, M. A. Sepsis: Pathophysiology and clinical management. **BMJ (Online)**, v. 353, p. i1585, 5 2016. Disponível em: <<https://www.bmj.com/content/353/bmj.i1585>>.

GREEN, D. R.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1109–1112, 8 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405151>>.

GUSTOT, T. Multiple organ failure in sepsis: Prognosis and role of systemic inflammatory response. **Current Opinion in Critical Care**, v. 17, n. 2, p. 153–159, 4 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21346564>>.

HAILESELASSIE, B. et al. Myocardial oxidative stress correlates with left ventricular dysfunction on strain echocardiography in a rodent model of sepsis. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 5, n. 1, p. 21, 12 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28405943>>.

HERRMANN, I. K. et al. Volatile anesthetics improve survival after cecal ligation and puncture. **Anesthesiology**, v. 119, n. 4, p. 901–906, 10 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4936901>>.

HOCHACHKA, P. W.; GUPPY, M. **Metabolic arrest and the control of biological time**. 1. ed. Cambridge (MA): Harvard Univ Press, 1987.

HOESEL, L. M. et al. Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. **Shock**, v. 24, n. 1, p. 40-47, 7 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15988319>>.

HOTCHKISS, R. S. et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1230-1251, 7 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10446814>>.

HOTCHKISS, R. S. et al. Sepsis and septic shock. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16045, 6 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5538252>>.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 2, p. 138–150, 1 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12519925>>.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 12, p. 862–874, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4077177>>.

HSIAO, H. W. et al. The decline of autophagy contributes to proximal tubular dysfunction during sepsis. **Shock**, v. 37, n. 3, p. 289–296, 3 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22089196>>.

HUBBARD, W. J. et al. Cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. 52–57, 12 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16374373>>.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSIS (ILAS), 2017. Disponível em: <<http://www.ilas.org.br>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

ISKANDER, K. N. et al. Sepsis: Multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 3, p. 1247–1288, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962548>>.

ISKANDER, K. N. et al. Shorter Duration of Post-Operative Antibiotics for Cecal Ligation and Puncture Does Not Increase Inflammation or Mortality. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0163005, 9 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5036876>>.

IWASHINA, T. et al. The Population Burden of Long-Term Survivorship After Severe Sepsis in Older Americans. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 60, n. 6, p. 1070–1077, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374893>>.

JAMES, A. M.; MURPHY, M. P. How mitochondrial damage affects cell function. **Journal of Biomedical Science**, v. 9, n. 6 Pt 1, p. 475–487, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372986>>.

JAWAD, I.; LUKSIC, I.; RAFNSSON, S. B. Assessing available information on the burden of sepsis: Global estimates of incidence, prevalence and mortality. **Journal of Global Health**, v. 2, n. 1, p. 010404, 6 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23198133>>.

JIN, H. et al. CIRP Induces Neutrophil Reverse Transendothelial Migration in Sepsis. **Shock**, v. 51, n. 5, p. 548–556, 5 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30148763>>.

KATZ, S. D. et al. Decreased activity of the L-arginine-nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure. **Circulation**, v. 99, n. 16, p. 2113–2117, 4 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10217650>>.

KAUKONEN, K. M. et al. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000–2012. **JAMA**, v. 311, n. 13, p. 1308–1316, 4 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24638143>>.

KAWASAKI, T. Update on pediatric sepsis: A review. **Journal of Intensive Care**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 7 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5518149>>.

KEMPKER, J. A.; MARTIN, G. S. The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 37, n. 2, p. 165–179, 6 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27229635>>.

KHANDPUR, R. et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. **Science translational medicine**, v. 5, n. 178, p. 178ra40, 3 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3727661>>.

KIM, H. S. et al. A tetrahydroisoquinoline alkaloid THI-28 reduces LPS-induced HMGB1 and diminishes organ injury in septic mice through p38 and PI3K/Nrf2/HO-1 signals. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 684–692, 11 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.08.016>>

KIM, Y. A. et al. Early blood lactate area as a prognostic marker in pediatric septic shock. **Intensive Care Medicine**, v. 39, n. 10, p. 1818– 1823, 10 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818093>>.

KIMURA, M.; SUZUKI, M.; ARAKI, S. 1996. In vitro and in vivo effects of riboflavin sodium phosphate on the phagocytic activity of peritoneal macrophages in mice. **Animal Feed Science and Technology**, v. 67, n. 4, p. 368-373, 1996. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/chikusan1924/67/4/67_4_368/_pdf>.

KODAMA, K. et al. Inhibitory mechanisms of highly purified vitamin B2 on the productions of proinflammatory cytokine and NO in endotoxin-induced shock in mice. **Life Sciences**, v. 78, n. 2, p. 134–139, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112685>>.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 3 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri3399.pdf>>.

KOZLOV, A. V et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis: do ICU patients die from mitochondrial failure? **Annals of Intensive Care**, v. 1, n. 1, p. 41, 9 2011. Disponível em: <<http://www.annalsofintensivecare.com/content/1/1/41>>.

KRAUT, J. A.; MADIAS, N. E. Lactic acidosis. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 24, p. 2309-2319, 12 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25494270>>.

KUMAR, H.; BOT, A. Innate immune recognition mechanisms and translational opportunities. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 2, p. 113-115, 4 2013. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23570312>>.

KWAN, A. et al. Transcriptional Instability during Evolving Sepsis May Limit Biomarker Based Risk Stratification. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–8, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3609793>>.

LAGU, T. et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 3, p. 754–761, 2012. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21963582>>.

LANGENBERG, C. et al. Renal blood flow in experimental septic acute renal failure. **Kidney International**, v. 69, n. 11, p. 1996–2002, 6 2006. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5000440>>.

LANKELMA, J. M. et al. Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 1, p. 59–68, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5203863>>.

LEE, H. T. et al. Isoflurane improves survival and protects against renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. **Shock**, v. 27, n. 4, p. 373–379, 4 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17414419>>.

LEE, M. et al. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 62, p. 181–207, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28455710>>.

LERMAN, Y. V.; KIM, M. Neutrophil Migration under normal and sepsis conditions. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 15, n. 1, p. 19–28, 11 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5111082>>.

LEROLLE, N. et al. Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: Apoptosis and leukocytic infiltration. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 3, p. 471–478, 3 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19924395>>.

LETEURTRE, S. et al. PELOD-2: An update of the PEdiatric logistic organ dysfunction score. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 7, p. 1761–1773, 7 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685639>>.

LEVI, M.; SCHULTZ, M.; VAN DER POLL, T. Sepsis and thrombosis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 39, n. 5, p. 559–566, 7 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23625756>>.

LEVY, B. Lactate and shock state: the metabolic view. **Current Opinion in Critical Care**, v. 12, n. 4, p. 315–321, 8 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16810041>>.

LEVY, R. J.; DEUTSCHMAN, C. S. Cytochrome c oxidase dysfunction in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 35, n. 9 SUPPL., p. S468–475, 9 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17713395>>.

LEVY, M. et al. Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. **Critical Care Medicine**, v. 43, n. 1, p. 3–12, 1 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275252>>.

LEWIS, A. J. et al. Use of biotelemetry to define physiology-based deterioration thresholds in a murine cecal ligation and puncture model of sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 44, n. 6, p. E420–E431, 6 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4868666>>.

LEWIS, A. J.; BILLIAR, T. R.; ROSENGART, M. R. Biology and Metabolism of Sepsis: Innate Immunity, Bioenergetics, and Autophagy. **Surgical Infections**, v. 17, n. 3, p. 286–293, 6 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4876546>>.

LI, J. L. et al. Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 6, p. 2410–2422, 2 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29644918>>.

LIBERT, C. et al. Part II: Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies (MQTiPSS) for Types of Infections and Organ Dysfunction Endpoints. **Shock**, v. 51, n. 1, p. 23–32, 1 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30106873>>.

LIU, V. et al. Hospital Deaths in Patients With Sepsis From 2 Independent Cohorts. **JAMA**, v. 312, n. 1, p. 90–92, 7 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24838355>>.

LIU, J. et al. H2S attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a PI3K/Akt-dependent mechanism. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 17, n. 5, p. 4064–4072, 5 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6468938>>.

LORENTE, L. et al. Sustained high serum malondialdehyde levels are associated with severity and mortality in septic patients. **Critical Care**, v. 17, n. 6, p. R290, 12 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055989>>.

LUHR, R. et al. Trends in sepsis mortality over time in randomised sepsis trials: A systematic literature review and meta-analysis of mortality in the control arm, 2002–2016. **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 241–249, 7 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31269976>>.

LUSTER, A. D. Chemokines-chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 7, p. 436–45, 2 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9459648>>.

MAHABADI, N.; BHUSAL, A.; BANKS, S. W. **Riboflavin Deficiency**. Treasure Island (FL): 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262062>>. Acesso em: 19 dez. 2019.

MAIER, S. et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 21, n. 6, p. 505–511, 6 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15167678>>.

MANSO, P. H. et al. Oxidative stress markers are not associated with outcomes after pediatric heart surgery. **Paediatric Anaesthesia**, v. 23, n. 2, p. 188–194, 10 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/pan.12040>>.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 7 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri3024.pdf>>.

MATICS, T. J.; SANCHEZ-PINTO, L. N. Adaptation and validation of a pediatric sequential

organ failure assessment score and evaluation of the Sepsis-3 definitions in critically ill children. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 10, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6583375>>.

MEDZHITOV, R. Septic shock: on the importance of being tolerant. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 799-800, 11 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24238335>>.

MENG, F. et al. Effect of Xuefu Zhuyu decoction pretreatment on myocardium in sepsis rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 2939307, 9 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30271451>>.

MERA, S. et al. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 119, n. 2, p. 155-163, 2 2011. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/49730773>>.

MERZA, M. et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice with Severe Acute Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 149, n. 7, p. 1920- 1931.e8, 12 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.026>>.

MICHAELI, B. et al. Effects of endotoxin on lactate metabolism in humans. **Critical Care**, v. 16, n. 4, p. R139, 7 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3580724>>.

MORIN, L. et al. Refractory septic shock in children: a European Society of Paediatric and Neonatal Intensive Care definition. **Intensive Care Medicine**, v. 42, n. 12, p. 1948–1957, 12 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27709263>>.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 1 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2605959>>.

NASCIMENTO, D. C. et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 8, p. 1718-1725, 8 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20543670>>.

NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nature Immunology**, v. 15, n. 7, p. 602–611, 7 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24940954>>.

NEIRA, R. A. Q.; HAMACHER, S.; JAPIASSU, A. M. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–15, 4 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29652944>>.

NESHER, L.; ROLSTON, K. V. I. The current spectrum of infection in cancer patients with chemotherapy related neutropenia. **Infection**, v. 42, n. 1, p. 5–13, 2 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23975584>>.

NICHOL, A. D. et al. Relative hyperlactatemia and hospital mortality in critically ill patients: A retrospective multi-centre study. **Critical Care**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2875540>>.

NICHOLS, E. K. et al. Suspected Outbreak of Riboflavin Deficiency among Populations Reliant on Food Assistance: A Case Study of Drought-Stricken Karamoja, Uganda, 2009–2010. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62976, 5 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3642060>>.

NOLT, B. et al. Lactate and Immunosuppression in Sepsis. **Shock**, v. 49, n. 2, p. 120-125, 2 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28767543>>.

NOURSHARGH, S.; RENSHAW, S. A.; IMHOF, B. A. Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why? **Trends in Immunology**, v. 37, n. 5, p. 273–286, 5 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.03.006>>.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 6 1979. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810>>.

OPAL, S. M.; VAN DER POLL, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. **Journal of Internal Medicine**, v. 277, n. 3, p. 277–293, 3 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25418337>>.

OSAME, S.; ARAKI, S.; KIMURA, M. Effects of vitamin B2 on neutrophil functions in cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 3, p. 493-495, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1292/jvms.57.493>>.

OSUCHOWSKI M. F; THIEMERMANN, C; REMICK, D. G. Sepsis-3 on the block: what does it mean for pre-clinical sepsis modeling? **Shock**, v. 47, n. 5, p. 658–660, 5 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5405003>>.

OSUCHOWSKI, M. F. et al. Abandon the mouse research ship? Not just yet! **Shock**, v. 41, n. 6, p. 463–475, 6 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4139038>>.

OSUCHOWSKI, M. F. et al. Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS): An international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis. **Shock**, v. 50, n. 4, p. 377–380, 10 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40635-018-0189-y>>.

PAOLI, C. J. et al. Epidemiology and costs of sepsis in the United States-an analysis based on timing of diagnosis and severity level. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 12, p. 1889–1897, 12 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30048332>>.

PARK, J. H. et al. Annexin A5 increases survival in murine sepsis model by inhibiting HMGB1-mediated proinflammation and coagulation. **Molecular Medicine**, v. 22, n. 8, p. 424–436, 9 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27447360>>.

PEECHAKARA, B. V.; GUPTA, M. **Vitamin B2 (Riboflavin)**. Treasure Island (FL): 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30247852>>. Acesso em: 3 fev. 2020.

PINTO, J. T.; ZEMPLINI, J. Riboflavin. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 973-975, 9 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5015041>>.

POGGI, C.; DANI, C. Sepsis and Oxidative Stress in the Newborn: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Targets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 9390140, 8 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30174784>>.

POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F. et al. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock**, v. 30, n. SUPPL. 1, p. 53-59, 10 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18704008>>.

POOL, R.; GOMEZ, H.; KELLUM, J. A. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 34, n. 1, p. 62-80, 1 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29149942>>.

POWERS, H. J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1352-1360, 6 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791609>>.

POWERS, H. J.; CORFE, B. M.; NAKANO, E. Riboflavin in development and cell fate. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 56, p. 229-245, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116702>>.

PRAUCHNER, C. A. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. **Burns**, v. 43, n. 3, p. 471-485, 5 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28034666>>.

PROCESS INVESTIGATORS, YEALY, D. M.; KELLUM, J. A. et al. A randomized trial of protocol-based care for early septic shock. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 18, p. 1683-1693, 5 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24635773>>.

PROUT, A. J. et al. Children with Chronic Disease Bear the Highest Burden of Pediatric Sepsis. **Journal of Pediatrics**, v. 199, p. 194- 199.e1, 8 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6063765>>.

PROWLE, J. J. et al. Renal Blood Flow During Acute Renal Failure in Man. **Blood Purification**, v. 28, n. 3, p. 216-225, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19648741>>.

RAVEN, K. Rodent models of sepsis found shockingly lacking. **Nature medicine**, v. 18, n. 7, p. 998, 7 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm0712-998a.pdf>>.

RAYMOND, S. L. et al. Sepsis is associated with reduced spontaneous neutrophil migration velocity in human adults. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. e0205327, 10 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205327>>.

REINHART, K. et al. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 5, p. 414-417, 8 2017. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp1707170>>.

REMICK, D. et al. Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 4, n. 2, p. 89-95, 8 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7496903>>.

REMICK, D. G. et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 13, n. 2, p. 110-116, 2 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10670840>>.

REMICK, D. G. et al. Premise for Standardized Sepsis Models. **Shock**, v. 51, n. 1, p. 4-9, 1 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6281773>>.

REMICK, D. G. et al. Six at six: Interleukin-6 measured 6 H after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. **Shock**, v. 17, n. 6, p. 463-467, 6 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069181>>.

REMICK, D. G.; WARD, P. A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. **Shock**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. 7-11, 12 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16374366>>.

REVELLY, J. P. et al. Lactate and glucose metabolism in severe sepsis and cardiogenic shock. **Critical Care Medicine**, v. 33, n.10, p. 2235-2240, 10 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16215376>>.

RHEE, C. et al. Incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, 2009-2014. **JAMA**, v. 318, n. 13, p. 1241-1249, 10 2017. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2654187>>.

RHEE, C. et al. Prevalence, Underlying Causes, and Preventability of Sepsis-Associated Mortality in US Acute Care Hospitals. **JAMA network open**, v. 2, n. 2, p. e187571, 2 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30768188>>.

RHODES, A. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 3, p. 304-377, 3 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28101605>>.

RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 5, p. 490-497, 3 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17138957>>.

RISHU, A. H. et al. Even Mild Hyperlactatemia Is Associated with Increased Mortality in Critically Ill Patients. **Critical Care**, v. 17, n. 5, p. R197, 9 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24025259>>.

RITTIRSCH, D.; HOESEL, L. M.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 137-143, 1 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17020929>>.

ROSSAINT, J.; ZARBOCK, A. Pathogenesis of Multiple Organ Failure in Sepsis. **Critical Reviews in Immunology**, v. 35, n. 4, p. 277-291, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26757392>>.

RUIZ, S. et al. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 4, n. 1, 12 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40635-016-0096-z>>.

RUTH, A. et al. Pediatric severe sepsis: Current trends and outcomes from the pediatric health information systems database. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 15, n. 9, p. 828–838, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25226500>>.

SAID, H. M.; ROSS, C. **Modern Nutrition in Health and Diseases**. 11. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

SANCHES, S. C. et al. Riboflavin (vitamin B-2) reduces hepatocellular injury following liver ischaemia and reperfusion in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 67, p. 65–71, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.013>>.

SCHLAPBACH, L. J. et al. Mortality related to invasive infections, sepsis, and septic shock in critically ill children in Australia and New Zealand, 2002-13: A multicentre retrospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 46–54, 1 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)71003-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)71003-5)>.

SCHLAPBACH, L. J. et al. Prediction of pediatric sepsis mortality within 1 h of intensive care admission. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 8, p. 1085–1096, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28220227>>.

SCHLAPBACH, L. J. et al. Prognostic accuracy of age-adapted SOFA, SIRS, PELOD-2, and qSOFA for in-hospital mortality among children with suspected infection admitted to the intensive care unit. **Intensive Care Medicine**, v. 44, n. 2, p. 179–188, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5816088>>.

SCHLAPBACH, L. J.; KISSOON, N. Defining Pediatric Sepsis. **JAMA Pediatrics**, v. 172, n. 4, p. 313-314, 4 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29459982>>.

SCHMOCH, T. et al. The Glyoxalase System and Methylglyoxal-Derived Carbonyl Stress in Sepsis: Glycotoxic Aspects of Sepsis Pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 657, 3 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28304355>>.

SCHRAMM, M. et al. Riboflavin (vitamin B2) deficiency impairs NADPH oxidase 2 (Nox2) priming and defense against *Listeria monocytogenes*. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 3, p. 728-741, 3 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24272050>>.

SCOTT, H. F. et al. Association Between Early Lactate Levels and 30-Day Mortality in Clinically Suspected Sepsis in Children. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 3, p. 249-255, 3 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28068437>>.

SCOTT, H. F.; KEMPE, A.; BAJAJ, L. Venous vs Arterial lactate and 30-day mortality in pediatric sepsis: In reply. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 8, p. 813–814, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28655033>>.

SEEKAMP, A.; HULTQUIST, D. E.; TILL, G. O. Protection by vitamin B2 against oxidant-mediated acute lung injury. **Inflammation**, v. 23, n. 5, p. 449–460, 10 1999. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A:1021965026580.pdf>>.

SEEMA. et al. Serum TNF-alpha and free radical scavengers in neonatal septicemia. **The Indian Journal Pediatrics**, v. 66, n. 4, p. 511-516, 7-8 1999. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02727159>>.

SHANKAR-HARI, M. et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) Members of the Sepsis Definitions Task Force and Delphi Study: HHS Public Access Aut. **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 775–787, 2 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4910392>>.

SHEN, X. F. et al. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1687–1697, 9 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5571534>>.

SHERWOOD, M.; GOLDMAN, R. D. Effectiveness of riboflavin in pediatric migraine prevention. **Canadian Family Physician**, v. 60, n. 3, p. 244-260, 3 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952759>>.

SILVA, E. et al. Sepsis: From bench to bedside. **Clinics**, v. 63, n. 1, p. 109–120, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2664172>>.

SINGER, M. 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://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968574>>.

SINGER, M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 66–72, 1 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916385>>.

SINGER, P. M. et al. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. **Lancet**, v. 364, n. 9433, p. 545–548, 8 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15302200>>.

SLATTER, D. A. et al. Reactions of lipid-derived malondialdehyde with collagen. **Journal of Biological Chemistry**, n. 274, p. 19661-19669, 1999. Disponível em: <<https://www.jbc.org/content/274/28/19661.short>>.

SOLLER, B. et al. Comparison of noninvasive ph and blood lactate as predictors of mortality in a swine hemorrhagic shock with restricted volume resuscitation model. **Shock**, v. 44, n. 13, p. 90–95, 8 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4498648>>.

SÔNEGO, F. et al. Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: Protective and deleterious. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 155, p. 1–7, 4 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4844928>>.

SONG, J. et al. Novel biomarkers for early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation in a mouse cecal ligation and puncture model. **Journal of Inflammation (United Kingdom)**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 3 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3637617>>.

SONG, L.; ZOU, Y.; CAO, Z. Comparison of two different models of sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 229, n. 222, p. 277–282, 9 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.03.058>>.

SOUTO, F. O. et al. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 2, p. 234–242, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20732989>>.

SPILLER, F. et al. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 89, n. Aug 1, p. 32–40, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.04.011>>.

SRIVASTAVA, A.; MANNAM, P. Warburg revisited: lessons for innate immunity and sepsis. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 6, p. 70, 3 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4353299>>.

STARR, M. E. et al. A new cecal slurry preparation protocol with improved long-term reproducibility for animal models of sepsis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e115705, 12 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4274114>>.

STEARNS-KUROSAWA, D. J. et al. The Pathogenesis of Sepsis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 19–48, 2 2011. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-pathol-011110-130327>>.

STERLING, S A. et al. Characteristics and Outcomes of Patients with Vasoplegic Versus Tissue Dysoxic Septic Shock. **Shock**, v. 40, n. 1, p. 11–14, 7 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3982587>>.

STIEL, L.; MEZIANI, F.; HELMS, J. Neutrophil Activation during Septic Shock. **Shock**, v. 49, n. 4, p. 371–384, 4 2018. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00024382-201804000-00004>>

STOLLER, J. et al. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. **Journal of Critical Care**, v. 31, n. 1, p. 58–62, 2 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.09.034>>.

STONER, H. B. et al. The effect of sepsis on the oxidation of carbohydrate and fat. **British Journal of Surgery**, v. 70, n. 1, p. 32–35, 1 1983. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6402049>>.

SUETRONG, B.; WALLEY, K. R. Lactic Acidosis in Sepsis: It's Not All Anaerobic: Implications for Diagnosis and Management. **Chest**, v. 149, n. 1, p. 252-261, 1 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26378980>>.

SVISTUNENKO, D. A. et al. Mitochondrial dysfunction in patients with severe sepsis: An EPR interrogation of individual respiratory chain components. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1757, n. 4, p. 262-272, 4 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2006.03.007>>.

SWAMYDAS, M. et al. CXCR1-mediated Neutrophil Degranulation and Fungal Killing Promote Candida Clearance and Host Survival. **Science translational medicine**, v. 8, n. 322, p. 322ra10, 1 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26791948>>.

TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 4, p. 1167-1172, 1 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313832>>.

TAKASU, O. et al. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 187, n. 5, p. 509-517, 1 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3733408>>.

TANG, D. et al. PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 158-175, 9 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3662247>>.

TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238-242, 4 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23535595>>.

TAVARES-MURTA, B. M. et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. 1056-1061, 5 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12006803>>.

THAKUR K. et al. Riboflavin and health: A review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 17, p. 3650-3660 11 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27029320>>.

TING TAN, R. S. et al. The synergy in cytokine production through MyD88-TRIF pathways is co-ordinated with ERK phosphorylation in macrophages. **Immunology and Cell Biology**, v. 91, n. 5, p. 377-387, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/icb.2013.13>>.

TORIO, C. M.; MOORE, B. J. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer. In: Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2006 Feb-Maio 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368492>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

TOYOSAWA, T. et al. Effects of intravenous infusion of highly purified vitamin B2 on lipopolysaccharide-induced shock and bacterial infection in mice. **European Journal of**

Pharmacology, v. 492, n. 2–3, p. 273–280, 5 2004a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15178375>>.

TOYOSAWA, T. et al. Highly Purified Vitamin B2 Presents A Promising Therapeutic Strategy for Sepsis and Septic Shock. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1820–1823, 3 2004b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977995>>.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**, n. 524, p. 13-30, 5 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27789233>>.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 10 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2343396>>.

TYML, K. et al. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 3, p. H1397-406, 9 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.3.H1397>>.

URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 668–676, 4 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16548892>>.

VINCENT, J. L.; DE BACKER, D. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 9, n. SUPPL. 4, p. 9–12, 8 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3226162>>.

VINCENT, J. L.; MARTINEZ, E. O.; SILVA, E. Evolving Concepts in Sepsis Definitions. **Critical Care Clinics**, v. 25, n. 4, p. 665–675, 10 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892246>>.

VINCENT, P. J. et al. Sepsis definitions: time for change. **Lancet**, v. 381, n. 9868, p. 774–775, 3 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4535310>>.

VINCENT, J. L. et al. ICON Investigators. Assessment of the worldwide burden of critical illness: The Intensive Care Over Nations (ICON). **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 2, n. 5, p. 380-386, 5 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24740011>>.

VINCENT, J. L. et al. The value of blood lactate kinetics in critically ill patients: A systematic review. **Critical Care Medicine**, v. 20, n. 1, p. 1–14, 8 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13054-016-1403-5>>.

VON DESSAUER, B. et al. Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management. **Critical Care Medicine**, v. 26, n. 1, p. 103.e1-7, 2 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20646907>>.

VOSS, O. H. et al. Lipopolysaccharide-induced binding of receptor CD300b to Tolllike

receptor 4 alters signaling to drive lethal cytokine responses that enhance septic shock. **Immunity**, v. 44, n. 6, p. 1365–1378, 6 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4917413>>.

WALLEY, K. R. et al. Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3847–3851, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC175549>>.

WALTZ, P. et al. Lipopolysaccharide induces autophagic signaling in macrophages via a TLR4, heme oxygenase-1 dependent pathway. **Autophagy**, v. 7, n. 3, p. 315–320, 3 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21307647>>.

WANG, Q. et al. Anti-inflammatory profile of levosimendan in cecal ligation-induced septic mice and in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Critical Care Medicine**, v. 43, n. 11, p. e508–e520, 11 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26468714>>.

WANG, Z. et al. Development of oxidative stress in the peritubular capillary microenvironment mediates sepsis-induced renal microcirculatory failure and acute kidney injury. **American Journal of Pathology**, v. 180, n. 2, p. 505–516, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.011>>.

WATANABE, E. et al. Sepsis Induces Extensive Autophagic Vacuolization in Hepatocytes – a clinical and laboratory based study. **laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 89, n. 5, p. 549–561, 5 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19188912>>.

WEISS, S. L.; DEUTSCHMAN, C. S. Elevated malondialdehyde levels in sepsis - something to 'stress' about? **Critical Care**, v. 18, n. 2, p. 125, 3 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4056888>>.

WEISS, S. L. et al. Global epidemiology of pediatric severe sepsis: the sepsis prevalence, outcomes, and therapies study. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 191, n. 10, p. 1147–1157, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451622>>.

WEISS, S. L. et al. The Epidemiology of Hospital Death Following Pediatric Severe Sepsis: When, Why, and How Children With Sepsis Die. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 18, n. 9, p. 823–830, 9 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28549024>>.

WEISS, S. L. et al. Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 21, n. 2, p. e52–e106, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32032273>>.

WHITE, L. E. et al. Acute kidney injury is surprisingly common and a powerful predictor of mortality in surgical sepsis. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 75, n. 3, p. 432–438, 9 2013. disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3823059/pdf/nihms-500342.pdf>>.

WHITE, R. H. et al. Hormonal and Metabolic Responses to Glucose Infusion in Sepsis Studied by the Hyperglycemic Glucose Clamp Technique. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 11, p. 345–353, 1987. Disponível em: <<https://core.ac.uk/display/77481644>>.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, v. 29, n. 2, p. 189–201, 8 1980. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6997619>>.

WIERSINGA, W. J. et al. Host innate immune responses to sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 36–44, 1 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916381>>.

WONG, S. L. et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis which severely impairs wound healing. **Nature medicine**, v. 21, n. 7, p. 815–819, 7 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26076037>>.

WU, Q. et al. The Tibetan medicine Zuotai differs from HgCl₂ and MeHg in producing liver injury in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 78, p. 1–7, 7 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.03.017>>.

YANG, L. et al. PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. **Nature Communications**, v. 5, p. 4436, 7 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25019241>>.

YANG, C. et al. Role of TXNIP/NLRP3 in sepsis-induced myocardial dysfunction. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 44, n. 2, p. 417–426, 8 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6605641>>.

YANG, Z. et al. Anti-inflammatory, anti-oxidative stress effect of Phascolosoma esculenta oligosaccharides on Escherichia coli-induced sepsis mice. **Food Science and Biotechnology**, n. 28, p. 1871–1879, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10068-019-00620-w>>.

YOSHII, K. et al. Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, p. 48, 4 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31058161>>.

ZAKY, A. et al. Characterization of cardiac dysfunction in sepsis: An ongoing challenge. **Shock**, v. 41, n. 1, p. 12–24, 1 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24351526>>.

ZANOTTI-CAVAZZONIA, S. L.; HOLLENBERG, S. M. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. **Current Opinion in Critical Care**, v. 15, n. 5, p. 392–397, 10 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633546>>.

ZHAI, X. et al. Lactate as a Potential Biomarker of Sepsis in a Rat Cecal Ligation and Puncture Model. **Mediators Inflammation**, 8352727, 3 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29706801>>.

ZHANG, F. et al. Neutrophil dysfunction in sepsis. **Chinese Medical Journal**, v. 129, n. 22, p. 2741–2744, 11 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5126167>>.

ZIMMERMAN, J. E.; KRAMER, A. A.; KNAUS, W. A. Changes in hospital mortality for United States intensive care unit admissions from 1988 to 2012. **Critical Care**, v. 17, n. 2, p. R81, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23622086>>.

ZINGARELLI, B. et al. Part I: Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies (MQTiPSS) for Study Design and Humane Modeling Endpoints. **Shock**, v. 51, n. 1, p. 10–22, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30106874>>.