



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

GUILHERME VERAS MASCENA

PERITONITE FECAL EM RATOS IDOSOS:
Resposta terapêutica a diferentes estratégias antibióticas

Recife
2018

GUILHERME VERAS MASCENA



PERITONITE FECAL EM RATOS IDOSOS:
Resposta terapêutica a diferentes estratégias antibióticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Área de concentração: Clínica e Experimental

Orientador: Profº. Dr. Carlos Teixeira Brandt.

Recife
2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRBA:1790

M395p Mascena, Guilherme Veras

Peritonite fecal em ratos idosos: resposta terapêutica a diferentes estratégias antibióticas / Guilherme Veras Mascena. – 2018.
69 f.: il.

Orientador: Carlos Teixeira Brandt

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndice.

1. Peritonite. 2. Carbapenêmicos. 3. Quinolonas. 4. Tratamento farmacológico. 5. Ratos. I. Brandt, Carlos Teixeira (orientador) II. Título.

617.91 CDD (23.ed)

UFPE (CCS 2019-243)

GUILHERME VERAS MASCENA

PERITONITE FECAL EM RATOS IDOSOS:
Resposta terapêutica a diferentes estratégias antibióticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Aprovada em: 14/12/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Flávio Kreimer (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Luiz de Figueiredo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Cecília Santos Cavalcanti Melo (Examinador Externo)
Faculdade de Medicina de Olinca

Prof. Dr. Leslie Clifford Noronha Araújo (Examinador Externo)
Faculdade de Medicina de Olinda

Dedico esta tese

*À minha esposa, Rossana, mulher de minha vida e parceira de todas as horas.
Obrigado por ter sido sol nos meus dias nublados.*

Às minhas filhas, Luísa e Júlia, que me apresentaram a redefinição da palavra amor.

Aos meus pais Joseivo de Sousa Mascena Veras (in memorian) e Márcia Maria Veras dos Santos, pelos primeiros e determinantes ensinamentos.

Ao meu irmão Gustavo Veras Mascena (in memorian) que em sua curta temporada deixou uma mensagem de fraternidade e amizade à toda prova.

Ao meu irmão, amigo e poeta Giuseppe Veras Mascena, torcedor incontestado de minhas pequenas conquistas.

Ao meu querido tio Hosano Marques. Esteve, como um pai, sempre ao meu lado. Sua bondade inspira a todos e torna mais digno o mundo ao seu redor.

AGRADECIMENTOS

Ao mestre e amigo *Carlos Teixeira Brandt* que, assim como Virgílio a Dante, serviu-me de guia pelas sendas tortuosas da Metodologia Científica. Sem ti, nada teria sido possível.

A *Dalton* e *Gisele Gadelha*, pela coragem e ousadia de criar um centro de excelência em ensino e pesquisa partindo apenas de um sonho. Obrigado pela confiança em mim depositada.

A *Diego Gadelha*, parceiro e apoiador de primeira hora desta pesquisa.

A *Maria Cecília Santos Cavalcanti Melo*, uma verdadeira entusiasta da pesquisa e da Ciência. Esteve sempre presente em todas as fases de minha caminhada na pós-graduação.

Aos amigos e parceiros científicos *Carlos Alberto Figueiredo Filho*, *Marcos Antônio Xavier de Lima Júnior* e *Thárcia Kiara Beserra Oliveira*, pela inestimável colaboração neste projeto.

“Se alguém quiser ser feliz, deverá procurar um bem permanente que não possa ser retirado em algum revés de sorte” (AGOSTINHO¹, 1993, p.130).

RESUMO

A maioria dos modelos experimentais que investigam sepse de origem abdominal utilizam animais jovens. Este estudo tem por objetivo avaliar a resposta terapêutica de ratos idosos a duas estratégias antimicrobianas. Foi realizado estudo de intervenção com 30 ratos idosos (18 meses de idade) que foram submetidos à indução de peritonite fecal autógena. Os animais foram divididos em grupo controle (sem intervenção antimicrobiana), e grupos de intervenção 1 e 2, sendo administrado no grupo 1 meropenem na dose única de 40mg/Kg e no grupo 2 moxifloxacino na dose única de 20mg/Kg. As duas intervenções ocorreram 6 horas após a indução da peritonite. Os animais foram acompanhados por 15 dias e submetidos à avaliação de morbimortalidade por escore anteriormente validado. Os animais dos três grupos apresentaram pesos semelhantes no início do estudo, mas o grupo controle apresentou média de peso significativamente menor final do seguimento ($p = 0,0045$). Todos os animais do grupo controle apresentaram hemoculturas positivas ao final do seguimento. No grupo 1 (meropenem) apenas dois animais tiveram cultura positiva e no grupo 2 (moxifloxacino) houve 4 animais com culturas positivas. O escore de morbimortalidade diferiu de maneira significativa entre o grupo controle e os grupos de intervenção (1 e 2) com $p = 0,003$. Não foram observadas diferenças entre os escores de morbimortalidade dos grupos 1 e 2 ($p = 0,6967$). Dentre as limitações deste estudo está a não randomização dos grupos e a avaliação efetiva da gravidade dos quadros de sepse nos animais estudados. o tratamento precoce da peritonite fecal autógena em ratos idosos alcançou resultados promissores com as duas estratégias antimicrobianas. Os novos modelos de sepse em animais devem buscar aproximar melhor o agravo séptico apresentado em humanos envelhecidos.

Palavras-chave: Peritonite. Carbapenêmicos. Quinolonas. Tratamento farmacológico. Ratos. Envelhecimento.

ABSTRACT

The majority of experimental models investigating sepsis of abdominal origin use young animals. This study aims to evaluate the therapeutic response of elderly rats managed by two antimicrobial strategies. An intervention study was performed with 30 elderly rats (18 months of age) that underwent autogenic fecal peritonitis induction. The animals were divided into a control group (without antimicrobial intervention), and intervention groups 1 and 2, group 1 being administered meropenem at a single dose of 40mg/kg and group 2 moxifloxacin at a single dose of 20mg/kg. The two interventions occurred 6 hours after induction of peritonitis. The animals were followed for 15 days and submitted to the evaluation of morbidity and mortality by a previously validated score. The animals of the three groups presented similar weights at the beginning of the study, but the control group had significantly lower mean weight at follow-up ($p = 0.0045$). All animals in the control group had positive blood cultures at the end of the follow-up. In group 1 (meropenem) only two animals had positive culture and in group 2 (moxifloxacin) there were 4 animals with blood positive cultures. The morbimortality score differed significantly between the control group and the intervention groups (1 and 2) with $p = 0.003$. No differences were observed between the morbidity and mortality scores of groups 1 and 2 ($p = 0.6967$). Among the limitations of this study one can observe the non-randomization of the groups and no effective evaluation of the sepsis severity in the studied animals. Early treatment of autogenic fecal peritonitis in elderly rats achieved promising results with both antimicrobial strategies. The new models of sepsis in animals should seek to better approximate the septic injury presented in ageing human beings.

Keywords: Peritonitis. Carbapenems. Quinolones. Drug therapy. Rats. Aging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	SOFA escore	18
Quadro 2 -	Comparação entre as definições tradicionais e do último consenso (Sepsis-3)	20
Quadro 3 -	Teorias do envelhecimento	21
Quadro 4 -	Principais alterações imunológicas associadas ao envelhecimento	22
Figura 1 -	Hierarquia das evidências científicas	29
Figura 2 -	Diluição das fezes	33
Figura 3 -	Homogeneização e filtração da solução fecal	33
Figura 4 -	Indução da peritonite fecal autógena	34
Figura 5 -	Pesos dos animais antes da indução	37
Figura 6 -	Evolução do peso dos animais durante o seguimento	38
Figura 7 -	Achados ilustrativos dos inventários das cavidades torácica e abdominal	39
Figura 8 -	Análise do teste de Kruskal-Wallis entre os escores de morbimortalidade	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Médias dos pesos dos animais (em gramas) entre o início e o fim do seguimento	37
Tabela 2 -	Achados da necropsia de cada animal	40
Tabela 3 -	Resultados das hemoculturas ao fim do seguimento	41
Tabela 4 -	Escore de morbimortalidade	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARRIVE	<i>Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments</i>
β -lactâmicos	betalactâmicos
CD4	grupamento de diferenciação
CESED	Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
Cobea	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DHEAS	sulfato de deidroepiandrosterona
DNA	ácido desoxirribonucleico
DU	débito urinário
ECG	escala de coma de Glasgow
FiO ₂	fração inspirada de oxigênio
°C	graus Celsius
GRADE	<i>Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation</i>
IL-2	interleucina 2
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IF γ	interferon-gama
ipm	incursões respiratórias por minuto
LPS	lipopolissacarídeos
MBE	medicina baseada em evidências
mmHg	milímetros de mercúrio
mmol/L	milimol por litro
NK	<i>natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	pressão arterial média
PaO ₂	pressão parcial de oxigênio
PCR	proteína C reativa
SNC	sistema nervoso central
SRIS	síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF- β	fator de necrose tumoral beta

TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TRH	terapia de reposição hormonal
UNIFACISA	Centro Universitário Unifacisa
UTI	unidades de terapia intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA	14
1.2	JUSTIFICATIVA DA INVESTIGAÇÃO	14
1.3	DEFINIÇÃO DE OBJETIVOS	15
1.3.1	Objetivo geral	15
1.3.2	Objetivos específicos	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	SEPSE	16
2.2	ENVELHECIMENTO E RESPOSTA À INFECÇÃO	20
2.3	MICROBIOLOGIA NA SEPSE DE FOCO ABDOMINAL	23
2.4	ANTIBIOTICOTERAPIA NA SEPSE DE FOCO ABDOMINAL	25
2.5	MEDICINA BASEADA EM EVIDÊNCIAS E PESQUISA TRANSLACIONAL	28
3	MÉTODOS	32
3.1	LOCAL DE ESTUDO	32
3.2	TIPO DE ESTUDO	32
3.3	SELEÇÃO	32
3.3.1	Critérios de inclusão	32
3.3.2	Critérios de exclusão	32
3.4	PROCEDIMENTOS	33
3.4.1	Procedimentos técnicos	33
3.4.2	Procedimentos analíticos	36
3.4.3	Procedimentos éticos	36
4	RESULTADOS	37
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO NA ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA	61
	ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA)	69

1 INTRODUÇÃO¹

1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

Apesar dos avanços na medicina, sepse continua sendo causa líder de morte e de custos em pacientes hospitalizados o que, por si só, fomenta pesquisas que ensejem melhor estratificação de risco e tratamento mais adequado e racional.²

O envelhecimento da população é fenômeno global e estima-se que o percentual de pessoas com mais de 60 anos alcance 21% da população mundial no ano de 2050.³ A presumível consequência desse envelhecimento será o aumento das doenças crônico-degenerativas e o recrudescimento da mortalidade dos quadros de sepse nessa faixa etária.⁴

Pacientes idosos são mais susceptíveis às infecções por combinação de morbidades, imunossenescência e outros fatores associados à institucionalização. Por essas especificidades, a sepse apresenta mortalidade aumentada em pacientes idosos, embora não existam recomendações de tratamento específicas para este grupo.^{5,6}

Animais idosos, por sua vez, exibem muitos dos defeitos imunológicos e do risco aumentado às infecções que são observados em humanos apresentando maior susceptibilidade e mortalidade em quadros sépticos quando comparados a animais mais jovens.^{7,8} A pesquisa experimental pode, dessa forma, oferecer novas descobertas para intervenções nesse grupo etário.

1.2 JUSTIFICATIVA DA INVESTIGAÇÃO

O estudo é justificado por não existirem trabalhos que avaliem a resposta ao uso de meropenem ou moxifloxacino em modelos experimentais com animais em idade avançada. A maioria dos estudos experimentais omite o peso e a idade dos animais e, em face dessa omissão, podem estar criando importante viés nos seus resultados.⁹ A idade, em ratos, influencia a imunidade inata e adquirida alterando o número e a função das células de defesa e é provável que interfira na resposta ao tratamento da sepse.⁸

¹Tese formatada conforme orientação da Biblioteca Central e Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da UFPE: ABNT NBR 14724:2011. Versão do manuscrito publicado na Revista Acta Cirúrgica Brasileira (ANEXO A).

1.3 DEFINIÇÃO DE OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

- Investigar a morbimortalidade de ratos idosos com peritonite fecal autógena tratados precocemente com meropenem ou moxifloxacino.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o quadro clínico da peritonite fecal nos três grupos ao longo de 15 dias;
- Avaliar a presença de bacteremia ao final da investigação;
- Descrever os achados da necropsia através de inventário da cavidade abdominal e torácica;
- Verificar a morbimortalidade nos três grupos aplicando escore já validado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SEPSE

Sepse é uma das mais antigas entidades clínicas da história da medicina cuja primeira descrição remonta aos tempos hipocráticos.¹⁰ Trata-se de síndrome com fisiopatologia ainda incerta que é identificada por sinais e sintomas num paciente com suspeita de infecção. Apesar dos avanços em seu diagnóstico precoce e nas novas estratégias de tratamento, ela persiste com taxas elevadas de mortalidade, especialmente quando a prescrição de antimicrobianos é retardada.^{11–15} Nos Estados Unidos, no início desse século, a incidência anual foi de 751.000 casos (3 casos/1.000 habitantes) e o número estimado de mortes foi de 251.000.¹⁶ Além disso, foi a responsável direta por mais de 5% dos gastos anuais com saúde naquele país e sua mortalidade hospitalar persiste entre 25% a 30%.^{17,18} Em maio de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu a sepsé como prioridade global em saúde e adotou uma resolução com chamamento aos seus 194 países membros para que adotassem medidas que melhorassem a prevenção, o diagnóstico e o manejo dos pacientes com sepsé.^{19,20}

Pacientes que sobrevivem ao quadro de sepsé grave frequentemente evoluem com transtornos físicos e psicológicos e têm chance triplicada de desenvolver transtornos cognitivos quando comparados a pacientes hospitalizados por outras razões.²¹ Assim, uma internação por sepsé pode ser o disparador de limitações que, em muitos casos, lembra quadro de demência.^{22–24}

A definição de sepsé tem evoluído bastante ao longo do tempo. Definições iniciais focavam numa visão então predominante de que a sepsé resultava da síndrome da resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro (SRIS) à infecção. Esta síndrome era inferida quando pelo menos dois dos seguintes critérios estivessem presentes: (1) temperatura acima de 38°C ou menor que 36°C; (2) frequência cardíaca acima de 90 bpm; (3) frequência respiratória acima de 20/min ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg ou (4) leucócitos $> 12.000 /\text{mm}^3$ ou $< 4.000 /\text{mm}^3$ com pelo menos 10% de formas imaturas. Sepsé grave era então definida como aquela que se associava à falência de algum órgão e choque séptico seria estabelecido quando uma hipotensão induzida pela sepsé persistisse apesar da reposição adequada de fluidos.²⁵ Esses critérios não necessariamente indicavam uma resposta desregulada ou ameaçadora da vida

podendo ser uma resposta apropriada que era frequentemente adaptativa. Várias causas não infecciosas preenchiam os critérios de SRIS e em muitos pacientes com sepse esses mesmos critérios não eram contemplados, tornando-o pouco acurado para o diagnóstico.^{26,27}

O conceito foi se modificando ao longo do tempo com foco maior na resposta do paciente com relação à virulência do agente infeccioso.²⁸ Seu entendimento atual se baseia na ativação tanto de mediadores pró como anti-inflamatórios com comprometimento cardiovascular, neuronal, autonômico, humoral, metabólico e na coagulação.²⁹ A definição de sepse e de choque séptico tem sido interpretada como disfunção sistêmica dos órgãos associada com uma resposta inflamatória desregulada do paciente à infecção.^{30,31} Essa disfunção orgânica é muito mais comumente múltipla do que isolada. O sistema respiratório é um dos que mais comumente se encontra envolvido e geralmente se expressa pela síndrome da angústia respiratória aguda que não é específica dos agravos infecciosos e que pode ocorrer em quadros de sepse de origem extrapulmonar. Caracteriza-se pelo achado de infiltrados pulmonares e piora progressiva das trocas gasosas geralmente levando o paciente à ventilação mecânica.³²

O envolvimento do sistema cardiovascular é expresso por hipotensão e instabilidade hemodinâmica com choque do tipo distributivo tipicamente exibindo resistência vascular periférica diminuída. A disfunção renal se manifesta com oligúria e insuficiência renal aguda ocorrendo em até 39% dos casos de sepse e sendo um fator de risco independente de mortalidade.^{33,34}

A disfunção gastrointestinal, por sua vez, pode se apresentar por íleo paralítico, colecistite acalculosa e úlcera péptica com sangramento gastrointestinal.³⁵

Disfunção hepática é uma manifestação menos comum da sepse sendo encontrada em até 13% dos casos. Todavia, deve ser salientado que o fígado tem papel central na resposta imune do hospedeiro quando acometido por sepse e sua disfunção interfere diretamente no desfecho clínico.³⁶

A coagulopatia da sepse se apresenta como um estado hipercoagulável associado ao consumo de plaquetas e fatores de coagulação comumente levando a coagulação intravascular disseminada.³⁷

O comprometimento neurológico na sepse tem sido reconhecido de maneira crescente como *delirium* agudo e se associa a maior morbidade e maior tempo de internação na unidade de terapia intensiva (UTI). Além de ser uma das mais precoces

manifestações de sepse, as anormalidades neurológicas têm difícil resolução e evoluem com prejuízos cognitivos mesmo depois de resolvido o quadro infeccioso.^{22–}

24,38

Pelo novo critério de diagnóstico do sepse, a avaliação da disfunção dos vários órgãos é inferida através de escore conhecido como SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) que originalmente era *Sepsis-related Organ Failure Assessment* (Quadro 1). Um escore SOFA aumentado está relacionado a um maior risco de morte.³⁹

Quadro 1 - SOFA escore

Sistema	Escore				
	0	1	2	3	4
Respiratório					
PaO ₂ /FiO ₂ mmHg	≥ 400	< 400	< 300	< 200 com suporte respiratório	< 100 com suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas x 10 ³ /μL	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Fígado					
Bilirrubina, mg/dL	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	> 12,0
Cardiovascular					
PAM	≥ 70 mmHg	< 70 mmHg	Uso de dopamina < 5 ou dobutamina (qualquer dose) *	Dopamina 5,1 - 15 ou epinefrina ≤ 0,1 ou norepinefrina ≤ 0,1 *	Dopamina > 15 ou epinefrina > 0,1 ou norepinefrina > 0,1 *
SNC					
Escore da ECG	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Renal					
Creatinina, mg/dL	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9	> 5,0
DU, ml/dia				< 500	< 200

PaO₂ = pressão parcial de oxigênio; FiO₂ = fração inspirada de oxigênio; PAM = pressão arterial média; SNC = sistema nervoso central; ECG = escala de coma de Glasgow; DU = débito urinário.

*As doses das catecolaminas são expressadas em μg/Kg/min por pelo menos 1 hora.

Fonte: Singer et al.³¹ (2016)

A disfunção multiorgânica causada por uma resposta desregulada do paciente à infecção que define a sepse é identificada por um escore SOFA ≥ 2 , sendo consequente a infecção suspeita ou documentada. Esse escore pode ser assumido como zero em pacientes que não têm disfunção orgânica preexistente. Um escore SOFA ≥ 2 reflete um risco de mortalidade global de aproximadamente 10% em pacientes internados com suspeita de infecção. Mesmo pacientes inicialmente estáveis podem deteriorar, o que enfatiza a gravidade da condição e a necessidade de intervenção precoce. Esse escore, considerado padrão ouro para manuseio da sepse, tem sido reconhecido como sensível para diagnóstico e prognóstico desses pacientes quando internados em unidades de terapia intensiva.⁴⁰

Outra ferramenta foi desenvolvida para predição de desfechos fatais nas síndromes sépticas para ser utilizada nos serviços de emergência ajudando a identificar pacientes com infecções que ameacem a vida e que tenham indicação de transferência para a UTI: o qSOFA (*quick* SOFA). Ele se compõe de três critérios: (1) frequência respiratória acima de 22 ipm, (2) alteração do estado mental e (3) pressão arterial sistólica ≤ 100 mmHg. Embora o qSOFA seja menos robusto que o escore SOFA, ele não requer testes laboratoriais e pode ser avaliado rápida e repetidamente sendo mais acurado para os cenários fora das UTI. A força tarefa que o desenvolveu sugere que pacientes que apresentem pelo menos dois dos três critérios do qSOFA devam ser prontamente considerados com possível infecção e posteriormente encaminhados para cuidados intensivos.⁴¹

Pacientes com choque séptico formam um subgrupo de pacientes com anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas profundas com mortalidade bastante aumentada. Podem ser identificados como aqueles pacientes que apresentem hipotensão persistente tendo que fazer uso de vasopressores para manter uma PAM ≥ 65 mmHg e tendo um nível de lactato sérico acima de 2 mmol/L (18 mg/dL) apesar de um suporte volêmico adequado. Hiperlactatemia e, sobretudo, acetilcarnitina plasmática elevada são marcadores de gravidade do quadro séptico diretamente associados ao aumento de mortalidade. Esses pacientes exigem um tratamento rápido e efetivo com cristaloides, vasopressores e, eventualmente, doses moderadas de hidrocortisona.^{42,43}

O termo “sepse grave”, por sua vez, foi excluído do último consenso sobre o tema. O quadro 2 sumariza a evolução dos conceitos aplicados à sepse.

Quadro 2 - Comparação entre as definições tradicionais e do último consenso (Sepsis-3)

	Definição tradicional	Definição do Consenso Sepsis-3
Sepse	Infecção suspeita ou conhecida + ≥ 2 critérios da SRIS	Infecção suspeita ou conhecida + ≥ 2 pontos do escore SOFA
Sepse grave	Sepse + falência de algum órgão	Não se aplica
Choque séptico	Sepse + hipotensão refratária após uso adequado de fluidos ou necessidade de vasopressores	Sepse + uso de vasopressores e lactato > 2 mmol/L apesar de suporte volêmico adequado

SRIS = síndrome da resposta inflamatória sistêmica; SOFA = *Sequential Organ Failure Assessment*
 Fonte: Shankar-Hari et al²⁸. (2016)

Um dos principais desafios para o tratamento da sepse repousa numa maior suspeição da síndrome e no início precoce do tratamento. Um fator limitante é a falta de consciência por parte da população e, por vezes dos médicos, da gravidade do problema. Uma das razões para isto é que a maioria das mortes por sepse são classificados por suas infecções subjacentes e não pela própria síndrome o que faz com que seu impacto seja subestimado. Por outro lado, o manuseio ideal da sepse persiste como assunto de discussão.⁴⁴

2.2 ENVELHECIMENTO E RESPOSTA À INFECÇÃO

O envelhecimento é processo inexorável que apresenta alguns determinantes genéticos, mas que é sobretudo secundário a fatores exógenos que continuamente atuam ao longo da vida.⁴ Ele é caracterizado pela perda progressiva da integridade fisiológica levando a prejuízo de suas funções e vulnerabilidade à morte. Essa vulnerabilidade é o principal fator de risco para uma série de enfermidades como doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, doenças neurovegetativas e sepse.⁴⁵

Muitas são as teorias que tentam explicar o racional biológico por trás do envelhecimento (Quadro 3).⁴⁶ A teoria da programação genética tem como mecanismo o acúmulo de mutações deletérias que pode ser inferido pelo encurtamento dos telômeros e algumas mutações genéticas determinando, desta forma, a expectativa de vida. A teoria da pleiotropia antagonística é baseada na inflamação crônica (*inflamm-aging*) que promove dano tecidual através de infecções repetidas. Outra teoria postula que a senescência limita o tamanho das populações e acelera o aparecimento de novas gerações com vistas a promover uma melhor adaptação a um meio ambiente sempre em constante mudança. A alocação dos

recursos metabólicos para a manutenção da vida, por sua vez, prioriza o dispêndio energético para as primeiras fases da vida envolvidas com a reprodução das espécies, fazendo com que as idades mais avançadas sofram, por vezes, com um desequilíbrio de recursos energéticos para promover, por exemplo, o reparo do DNA.⁴⁶⁷

Quadro 3 - Teorias do envelhecimento

Teoria	Mecanismo	Racional
Programação genética	Acúmulo de mutações deletérias	Encurtamento dos telômeros e mutações determinam geneticamente a expectativa de vida
Pleiotropia antagonística	Inflamação crônica que promove dano tecidual	Repetidas infecções ao longo da vida induzem à <i>inflamm-aging</i> com dano tecidual
Hipótese da soma descartável	Seleção da fecundidade sobre a longevidade	A seleção natural favorece o uso de energia para termogênese e fertilidade sobre reparos genéticos em mamíferos

Fonte: Opal et al.⁽⁴⁶⁾ (2005)

O sistema imune é regulado por vários hormônios como o do crescimento, os esteroides adrenais e os sexuais.⁴⁸ Em grande parte, a imunossenescência é reflexo das profundas modificações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que se processam com o avanço da idade. Em idosos, observa-se redução de até 90% nos níveis de sulfato de deidroepiandrosterona (DHEAS), sabidamente estimulante do sistema imunológico. Os níveis de cortisol, reconhecido imunossupressor, mantêm-se elevados nessa faixa etária.⁴⁹⁻⁵¹

Os defeitos imunológicos associados ao envelhecimento, a chamada imunossenescência, afeta bastante a resposta imune adaptativa tanto celular como humoral (Quadro 4). A resposta inata, que consiste principalmente nos fagócitos (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas), nos mastócitos, eosinófilos e nas células *natural killer* (NK), é largamente poupada mesmo em idade avançadas.⁵²⁻⁵⁴ Os neutrófilos, defesa imune primária contra infecções, embora não apresentem diminuição em seu número com o avançar da idade, apresentam uma diminuição de sua capacidade quimiotática e promovem uma lesão tecidual maior, reflexo da liberação de suas enzimas proteolíticas.^{55,56} Outros fatores alterados com a idade são a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a sua capacidade fagocítica. Curiosamente o número de células *natural killer* (NK) aumenta com a idade,

embora a citotoxicidade e a produção de citocinas e quimiocinas como a interleucina 8 (IL-8), estejam reduzidas. Isto pode ser explicado pela queda de zinco encontrada nos idosos já que a sua suplementação pode melhorar as funções dessas células. Outras funções das células NK, como a secreção de quimiocinas ou interferon-gama (IF γ) em resposta à interleucina 2 (IL-2) também estão diminuídas nos idosos. As células dendríticas, os principais apresentadores de antígenos do sistema imune, também têm sua função diminuída com o envelhecimento.^{57–59}

Quadro 4 - Principais alterações imunológicas associadas ao envelhecimento

Imunidade inata	Neutrófilos: diminuição da capacidade quimiotática.
	NK: em número aumentado, mas com citotoxicidade e produção de citocinas reduzida.
	Células dendríticas: função diminuída.
Imunidade adquirida	Linfócitos T: redução de número e de diversidade de repertório.
	Linfócitos B: diminuição de número e diversidade de anticorpos.
	Aumento de auto anticorpos.

NK: células natural killer.

Fonte: Alonso-Fernández et al.⁽⁵²⁾ (2011)

Uma das anormalidades imunológicas mais notáveis na imunossenescência é a perda gradual dos linfócitos T CD8 e em menor grau as células T CD4 que reconhecem e respondem a novos antígenos. Isso decorre, em parte, de uma involução e perda de função do timo. Os linfócitos B apresentam uma resposta humoral enfraquecida com modificações no repertório de receptores de superfície, vazão dos precursores na medula óssea e aumento da produção de auto anticorpos. Além disso, exibem alterações no processo de diferenciação em plasmócitos gerando uma reduzida produção de anticorpos contra novos antígenos, embora a imunidade humoral contra antígenos de memória permaneça praticamente intacta.^{60–63}

Inflamm-aging foi um termo inicialmente cunhado no início deste século que foi definido como diminuição global na habilidade de lidar com diferentes estressores, associado a um estado de inflamação crônica que se associa e é mesmo parte da imunossenescência.⁶⁴ Trata-se de uma inflamação de baixa intensidade e persistente que é considerada um fator de risco adicional de morbimortalidade no idoso. Este estado pró-inflamatório apresenta implicações diretas em doenças tão diversas como osteoporose, aterosclerose, diabetes ou doença de Parkinson, por exemplo. Em que

pese se observar níveis aumentados de proteína C reativa (PCR) e interleucina 6 (IL-6) neste cenário, não há ainda consenso sobre um marcador confiável que possa mensurar a extensão dessa inflamação.^{65–67} Entre os prováveis estímulos da *inflamm-aging* estão inflamações virais crônicas, a adiposidade, hábitos dietéticos e alterações na composição da microbiota intestinal que comumente se associam ao envelhecimento.^{68–72}

As anormalidades imunológicas observadas com o envelhecimento afetam a saúde dos idosos e impõem desafios ao uso de algumas estratégias terapêuticas neste grupo. Embora a maioria dos cânceres ocorram em idosos, os ensaios clínicos são realizados em boa parte com voluntários mais jovens.⁷³ Nos dias atuais, a imunooncologia já dispõe de estratégias terapêuticas de vanguarda utilizando anticorpos, adjuvantes, citocinas, peptídeos e terapias celulares específicas para pacientes de idades distintas.⁷⁴

2.3 MICROBIOLOGIA NA SEPSE DE FOCO ABDOMINAL

As infecções abdominais difusas, denominadas de peritonite, podem ser classificadas em primárias, secundárias e terciárias.⁷⁵ A peritonite primária, também chamada de espontânea, é uma infecção geralmente monomicrobiana, ocorre por contaminação via hematogênica, linfática ou transmural (translocação bacteriana) e não se associa a perda da integridade física do trato gastrointestinal. Ela é rara e ocorre principalmente na infância bem como em pacientes cirróticos.⁷⁶ Na forma secundária, mais comum, há uma quebra da barreira mucosa por um envolvimento intra-abdominal próprio (apendicite, diverticulite, colecistite, etc) ou decorrente de procedimentos cirúrgicos e traumatismos abdominais. Deiscências anastomóticas são causas comuns de peritonite secundárias no período pós-operatório.⁷⁷ A peritonite terciária é uma infecção recorrente da cavidade abdominal que se segue após uma peritonite primária ou secundária. É uma entidade pobremente definida e é reconhecida como um processo infeccioso do abdome em que a deficiência dos mecanismos de defesa do abdome e a falta de controle do processo infeccioso determinam a peritonite difusa persistente mesmo após um tratamento adequado.^{78–}

80

A etiologia microbiana das infecções intra-abdominais está na dependência do nível de rompimento do peritônio e dos órgãos acometidos. A flora gastrointestinal

é a principal fonte dessas infecções. A porção superior (estômago, duodeno, jejuno e íleo superior) contém relativamente poucos microrganismos (10^3 a 10^4 organismos por grama de tecido) e a presença de bactérias anaeróbias é menor. A maioria é composta de cocos Gram positivos, particularmente estreptococos, e lactobacilos. São considerados uma flora de transição da cavidade oral e não verdadeiros colonizadores do trato gastrointestinal superior.^{81,82} No intestino delgado mais distal os cocos Gram positivos ainda se apresentam, mas bacilos anaeróbicos Gram negativos começam a ser observados. O íleo usualmente contém um número semelhantes de bactérias aeróbias e anaeróbias e, em sua porção distal, esses agentes já contam 10^8 organismos por grama de tecido chegando a 10^{11} no cólon. Nesta região os microrganismos anaeróbicos predominam até 1000 vezes mais do que os aeróbicos.⁸³

Mais de 500 a 600 espécies microbianas distintas podem ser cultivadas a partir de fezes normais e a densidade dessa flora é suficientemente grande para que as células microbianas superem as células humanas em um fator de 10 para um. A estabilidade da flora gastrointestinal é mantida por vários fatores, incluindo a competição por nutrientes e sítios de ligação da mucosa, motilidade intestinal, pH local, fluxo biliar e a produção de substâncias antimicrobianas tanto pelo epitélio intestinal como por outros organismos luminais.⁸⁴

A maioria das infecções intra-abdominais resultam de perfurações do trato gastrointestinal. *Escherichia coli* é o microrganismo mais comumente isolado de pacientes em mais de 50% dos casos.⁸⁵⁻⁸⁷ Muitos outros bacilos entéricos Gram negativos são detectados, incluindo espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*. Bacilos Gram negativos não coliformes, particularmente *Pseudomonas aeruginosa*, podem também ser isoladas nessas infecções.⁸⁸

Cocos Gram positivos são frequentemente encontrados em infecções intra-abdominais sendo a maioria estreptococos do tipo *viridans*. Espécies de *Enterococcus* são isolados em até 29% dos pacientes.^{87,89,90}

Microrganismos anaeróbicos são importantes componentes da maioria das infecções intra-abdominais embora não sejam isolados devido às técnicas laboratoriais aplicadas pois seu isolamento exige métodos de colheita, de transporte e de cultivo dos espécimes apropriados. O mais prevalente é o *Bacteroides fragilis*, presente em até 50% dessas infecções.⁹¹ A presença de bactérias anaeróbias é a principal causa da formação de abscessos na maioria dos sítios anatômicos. A

explicação biológica é que a cápsula polissacarídica, que tem sido bem estudada em *B. fragilis*, pode ser abscessogênica.⁹²

Fungos são agentes menos comumente envolvidos em sepse abdominal, mas sua importância tem aumentado nos últimos anos seja pelo aumento de sua prevalência, seja pela gravidade dos pacientes envolvidos. Sepse intra-abdominal com espécies de *Candida* está particularmente associada a resultados muito desapontadores e sua prevalência em pacientes com peritonite secundária chega a 28.9%.^{93,94} Não existem, até o momento, evidências claras de que a cobertura antifúngica empírica em pacientes com sepse de origem abdominal traga benefícios na redução de sua morbimortalidade.⁹⁵

Infecções hospitalares apresentam uma microbiologia distinta. A própria flora gastrointestinal normal é alterada no ambiente hospitalar. Quando comparada com as infecções comunitárias, as infecções intra-abdominais hospitalares apresentam uma frequência maior de bactérias Gram negativas, com *E coli* menos comumente isolada e *Enterobacter* e *Pseudomonas* mais frequentemente encontradas. Observa-se ainda redução da frequência de isolamento de estreptococos, aumento dos *Enterococcus* e dos fungos, sendo predominantemente *Candida albicans*.^{92,96}

2.4 ANTIBIOTICOTERAPIA NA SEPSE DE FOCO ABDOMINAL

Os princípios que norteiam o tratamento da sepse de origem abdominal pouco se modificaram desde o início do século XX: eliminar o foco séptico, remover o tecido necrótico e drenar o material purulento.⁹⁷ O momento e a seleção de pacientes para cirurgia, por outro lado, sofreram profundas mudanças com o advento das modernas técnicas de medicina intensiva, desenvolvimento de novos antimicrobianos e o surgimento de novas ferramentas diagnósticas.⁹⁸

Existem muitas estratégias antimicrobianas para o tratamento das infecções intra-abdominais. O princípio geral que orienta a escolha do agente é que ele seja efetivo contra os bacilos Gram negativos aeróbicos, cocos Gram positivos aeróbicos e os microrganismos anaeróbicos mais comumente encontrados nesse cenário.^{99,100}

Os agentes β -lactâmicos (betalactâmicos) são uma classe ampla de antimicrobianos que inclui a penicilina e seus derivados e possuem o núcleo β -lactâmico em sua estrutura molecular.^{101,102} Muitos agentes betalactâmicos têm boa eficácia no tratamento das infecções intra-abdominais tanto como agentes isolados

como em associação com metronizadol. Eles apresentam ação bactericida e atuam impedindo a síntese da parede celular bacteriana.^{103,104} Existem quatro classes de betalactâmicos: (1) os penicilínicos que derivam diretamente da penicilina como a amoxicilina e ampicilina, (2) as cefalosporinas de primeira (cefazolina, por exemplo), segunda (cefoxitina), terceira (ceftriaxona) e quarta gerações (cefepime), (3) os carbapenêmicos como imipenem, meropenem e ertapenem e (4) o clavulanato que tem espectro mínimo de atividade, mas é usado como inibidor da betalactamase que é uma proteína produzida pelas bactérias e consegue neutralizar total ou parcialmente a ação dos betalactâmicos.^{105,106} A formulação amoxicilina/clavulanato combina uma aminopenicilina com um inibidor da betalactamase e pode ser usada como agente único pois o clavulanato expande o espectro de atividade da amoxicilina fornecendo cobertura adequada para o *Bacteroides fragilis*.^{107,108} Da mesma forma ticarcilina com clavulanato e piperacilina com tazobactam (outro inibidor da betalactamase) também podem ser opções para uso isolado em pacientes de baixo e alto risco, respectivamente.⁹⁰

As fluoroquinolonas são agentes bactericidas e atuam inibindo a síntese de DNA ao interferir com a DNA girase (topoisomerase II) e a topoisomerase IV.¹⁰⁹ Apresentam excelente penetração no tecido peritoneal com bom espectro de cobertura para microrganismo Gram positivos e Gram negativos. Moxifloxacino pode ser usado como agente único em infecções abdominais porque tem boa atividade contra o *Bacteroides fragilis*. Em pacientes hospitalizados não deve ser usado isoladamente pois apresenta atividade reduzida contra *Pseudomonas* quando comparado a outras quinolonas.¹¹⁰ Já a ciprofloxacina e a levofloxacina apresentam boa atividade frente a *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* e podem ser utilizados preferencialmente associados ao metronizadol.¹¹¹

Os glicopeptídeos, como a vancomicina e a teicoplanina, são agentes com atividade bactericida contra bactérias Gram positivas, particularmente o *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. Esses agentes inibem a síntese da parede celular a inibir a polimerização.¹¹²

As diretrizes americanas para o manejo das infecções intra-abdominais identificam três categorias distintas de cenário clínico para tratamento: (1) infecções comunitárias de baixo a moderado risco, (2) infecções comunitárias de alto risco e (3) infecções hospitalares.¹¹³ A gravidade da infecção pode ser inferida através escore de

risco APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*).¹¹⁴ Esta disposição é bastante semelhante à aplicada nas diretrizes canadenses.¹¹⁵

No cenário de infecções intra-abdominais de baixo a moderado risco, o esquema antimicrobiano deve prover uma cobertura para estreptococos Gram positivos, bacilos Gram negativos e bacilos anaeróbicos (com especial cobertura para *Bacterioides fragilis*). Esquemas únicos como cefoxitina, ticarcilina/clavulanato, ertapenem ou moxifloxacino podem ser utilizados. Regimes combinados ao metronidazol podem incluir cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, ciprofloxacina ou levofloxacina.¹¹³

Para pacientes com infecções comunitárias de alto risco, faz-se necessária tanto a cobertura adicional para *Enterococcus faecalis* sensível à penicilina como para *Pseudomonas aeruginosa*. Regimes de agentes únicos podem incluir doripenem, meropenem, imipenem/cilastatina e piperacilina/tazobactam. Associados ao metronidazol podem ser utilizados neste cenário cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina ou levofloxacina.¹¹⁶

Em pacientes com infecções hospitalares é necessária uma cobertura mais ampla. Além dos microrganismos já habitualmente cobertos nos esquemas anteriores, faz necessária uma cobertura adicional para *Pseudomonas aeruginosa* resistente, espécies de *Acinetobacter* e enterococos. As diretrizes orientam que a cobertura leve em consideração o perfil microbiológico das respectivas instituições.¹¹³ Os esquemas sugeridos incluem imipenem/cilastatina, meropenem, doripenem ou piperacilina/tazobactam como agentes únicos. Ceftazidima ou cefepime em combinação com metronidazol também são opções possíveis. Além disso, cobertura para *Staphylococcus aureus* meticilina resistente com vancomicina é recomendado.¹¹⁷

2.5 MEDICINA BASEADA EM EVIDÊNCIAS E PESQUISA TRANSLACIONAL

Nos tempos hipocráticos, médicos tomavam condutas clínicas que em muito pouco diferiam dos curandeiros de aldeia. Pesquisadores pioneiros como Rudolph Virchow, Claude Bernard e Louis Pasteur cimentaram a inflexão do pensamento médico. Ensaios clínicos primitivos com o famoso estudo de James Lind que levou à descoberta posterior do tratamento e prevenção do escorbuto ainda no século XVIII fincaram os alicerces da pesquisa médica moderna e transportaram a medicina de uma era empirismo para os dias atuais onde as condutas são, ou deveriam ser, norteadas por evidências.¹¹⁸

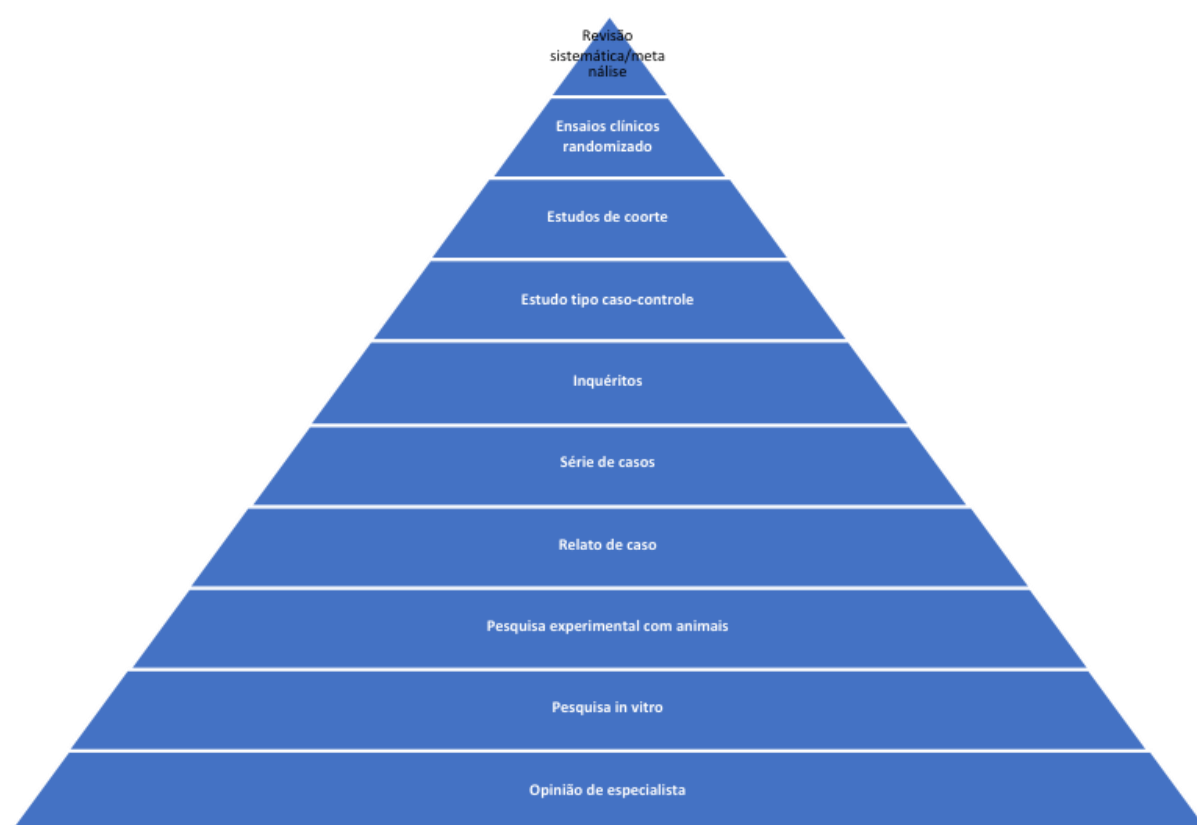
A expressão “medicina baseada em evidências” (MBE) apareceu pela primeira vez publicada em 1991 no *American College of Physicians’ Journal Club*¹¹⁹, mas pelo menos 10 anos antes disso um grupo de epidemiologistas clínicos da Universidade de McMaster, liderado por David Sackett, já orientavam os clínicos sobre como ler artigos científicos e disseminavam as diretrizes que norteariam “o uso consciencioso das melhores evidências disponíveis na abordagem de pacientes individuais”.¹²⁰ Desde então a MBE emergiu como um novo paradigma para o ensino e aplicação da medicina cuja decisão clínica é baseada fundamentalmente em estudos e evidências de boa qualidade em contraponto às condutas cujo embasamento eram a experiência do médico, a tradição de muitas decisões ou até mesmo a lógica absolutamente empírica de determinado procedimento. O ponto central na epistemologia da MBE é que só se deve acreditar ou confiar numa evidência quando o delineamento da criação desta evidência for determinado por processos confiáveis.¹²¹

Algumas estimativas sugerem que metade do esforço de pesquisa é desperdiçado a cada etapa de geração e relato desses estudos o que explica porque cerca de 85% das pesquisas não são aplicadas.¹²² Assim sendo, saber fazer a leitura crítica das evidências disponíveis é uma habilidade que qualquer profissional da saúde precisa desenvolver. Os prejuízos trazidos pela aplicação de condutas que não estão amparadas em boas evidências científicas são incalculáveis. Milhões de mulheres saudáveis receberam terapia de reposição hormonal (TRH) com base num benefício apenas hipotético. Diversos ensaios randomizados demonstraram que a TRH não traz redução de risco cardiovascular e sim aumento da incidência de câncer de mama.¹²³ A conduta de prescrever antiarrítmicos em pacientes infartados que

parecia muito lógica e bem-intencionada mostrou-se desastrosa. Em que pese o fato de que boa parte das mortes em infartados decorrem de arritmias malignas, não havia evidências robustas que amparassem essa medida. Essa falta de apreço à aplicação de princípios elementares da MBE foi responsável direta por milhares de mortes. Mais americanos morreram pelo uso desses antiarrítmicos do que em toda guerra do Vietnã.¹²⁴

Um dos princípios epistemológicos da MBE pressupõe que quanto melhor a qualidade da evidência, mas próximo se está da verdade. Criou-se então uma hierarquização das evidências (Figura 1) partindo da opinião do especialista (a mais frágil das evidências) até a metanálises e metarevisões de ensaios clínicos randomizados que compõem a melhor evidência disponível.¹¹⁸

Figura 1 - Hierarquia das evidências científicas



Fonte: Djulbegovic et al.¹¹⁸ (2017)

Uma vez que mesmo os ensaios clínicos randomizados podem ter vieses grosseiros, metanálises que utilizem tais estudos também ficam comprometidas. É por isso que existem vários sistemas desenvolvidos, com o GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*), para avaliar a qualidade desses estudos reduzindo assim os erros e melhorando a qualidade das recomendações que compõem as diretrizes sobre os mais variados assuntos produzindo uma hierarquia de evidências muito mais sofisticada. A força de uma recomendação refletirá em que medida os efeitos desejáveis de uma intervenção superam os riscos com base na melhor estimativa dessas consequências.^{125,126} As evidências científicas, claro, não determinam as decisões clínicas. Elas são norteadas pelas evidências, mas são compartilhadas e sopesadas com o paciente levando em conta riscos, benefícios, custos, alternativas, considerações culturais, dentre outros.^{127,128}

“Pesquisa translacional” é o termo utilizado para as descobertas científicas que perpassam da pesquisa básica, experimental, alcançam os ensaios clínicos e chegam à implantação de normas e condutas na prática clínica. Trata-se de uma nova informação, um novo conhecimento, que vai da bancada ao leito (*from bench to bedside*).¹²⁹ O primeiro estágio dessa translação corresponde aos estudos de eficácia com atenção à validade interna. Posteriormente a resultante de evidências dos ensaios clínicos produzem impacto na tomada de decisão clínica.^{130,131}

Dois conceitos cruciais para a aplicabilidade da pesquisa translacional são validade interna e validade externa. A validade interna é o grau em que um estudo estabelece a relação de causa e efeito entre o tratamento e o resultado observado. Ela é alcançada ao se minimizar ao máximo os possíveis vieses. A validade externa, por sua vez, é definida como o grau em que os achados baseados em uma amostra do estudo podem ser generalizados para outras populações e contextos.¹³² Ambos os tipos de validade são críticos, embora os projetos de estudo enfrentem um equilíbrio entre a validade interna e externa uma vez que o fortalecimento de um tipo de validade pode comprometer o outro. Ao se projetar e executar estudos de pesquisa, as ameaças à validade interna e externa devem ser duplamente consideradas.¹³³

A translação do conhecimento ocorre em duas etapas. A fase inicial (T1) inclui estudos de pré-intervenção como a pesquisa experimental com animais e a pesquisa pré-clínica. Estas pesquisas podem identificar mecanismos de doença e intervenções ou tratamentos promissores - aqueles para os quais há motivos para acreditar que

haverá efeitos positivos se aplicados de forma mais ampla, inclusive para os seres humanos. Nesta fase é fundamental que o estudo tenha validade interna. A segunda etapa (T2) da pesquisa translacional compõe os estudos de eficácia e efetividade onde ensaios clínicos testam se aquela intervenção funciona em grandes populações de seres humanos no contexto do mundo real e, para isso, o estudo precisa apresentar validade externa para a generalização dos resultados.^{134,135} Outros autores dividem pesquisa translacional em três etapas: T1 – translação da pesquisa básica para humanos (avaliação de intervenção em animais, por exemplo), T2 – translação para o tratamento clínico (avaliação de eficácia e segurança) e T3 – translação para a prática (implementação e adoção de condutas).^{136–138}

3 MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO

Núcleo de Investigação Experimental e Biotério da Unifacisa em Campina Grande, Paraíba.

3.2 TIPO DE ESTUDO

Longitudinal, prospectivo, analítico e de intervenção.

3.3 SELEÇÃO

3.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos 30 ratos machos adultos Wistar (*Rattus Novergicus*, *Rodentia Mammalia*) com 18 meses de idade, sem qualquer doença ou agravo proveniente da colônia de criação do biotério da Unifacisa. Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle, grupo meropenem e grupo moxifloxacino.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os animais que no momento da indução da peritonite por meio da injeção de solução fecal apresentassem sinais de qualquer fluido orgânico no aspirado da cavidade peritoneal.

Também foram excluídos os animais que desenvolveram desnutrição ou os que apresentarem nas fezes qualquer sinal de processo inflamatório, incluindo pus ou sangue.

3.4 PROCEDIMENTOS

3.4.1 Procedimentos técnicos

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com dimensão de 430x430x200 mm (comprimento x largura x altura) num ambiente com temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclo de luz/escuridão (12h) e tiveram livre acesso a alimentação e água *ad libitum*. A ração utilizada era própria para a espécie de ratos Wistar. A suspensão fecal autógena foi preparada coletando-se 2 gramas de fezes de cada rato individualmente e dissolvendo-se em 20 ml de solução salina a 0,9% (Figura 2).

Figura 2 - Diluição das fezes



Fonte: Autor

A mistura foi homogeneizada e filtrada com uma gaze para remoção de grandes partículas (Figura 3).

Figura 3 - Homogeneização e filtragem da solução fecal.



Fonte: Autor

A dosagem apropriada dessa solução a ser utilizada deveria ser capaz de promover infecção retroperitoneal com formação de abscesso em cavidade abdominal e torácica sem, no entanto, levar ao óbito já nas primeiras horas pós indução. A dosagem de 6 ml/Kg de rato já havia sido utilizada em estudo anterior, mas uma taxa de mortalidade excessiva impossibilitou a análise da resposta ao meropenem em ratos de mesma idade.¹³⁹ Um estudo piloto foi realizado com dez ratos Wistar idosos (18 meses de idade) submetidos à indução de peritonite fecal autógena com 4,0 ml/Kg de rato. A solução foi injetada na cavidade intraperitoneal, no quadrante ilíaco esquerdo, usando agulha de 30 mm x 1,2 mm (Figura 4).

Figura 4 - Indução da peritonite fecal autógena



Fonte: Autor

Os resultados iniciais foram satisfatórios com os animais tendo conseguido sobreviver às primeiras 48 horas de observação. Os ratos do grupo piloto (10 animais) foram incluídos no grupo controle e os demais animais (20) tiveram a peritonite induzida da mesma forma.

Os grupos de intervenção terapêutica (meropenem e moxifloxacino) foram submetidos a administração de antimicrobiano 6 horas após a indução da peritonite sendo meropenem utilizado na dose única de 40 mg/Kg e moxifloxacino na dose única de 20 mg/Kg. Os animais foram acompanhados por uma médica veterinária com vistas à detecção de infecção grave através da observação de atividade, peso e temperatura corporal e frequência respiratória. Todos os animais que morreram foram imediatamente submetidos a uma inspeção da cavidade abdominal através de incisão xifo-pubiana na pele da linha média abdominal e torácica através de tesoura cirúrgica

para identificação de abscessos, aderências e sinais macroscópicos de infecção como pus em cavidade livre ou em órgãos sólidos. Foi também realizada hemocultura através de punção da aorta abdominal com agulha 30 x 1,5 mm e aspirado 2 mL do sangue que foi acomodado em frascos de hemocultura e incubados a 35 ± 2 °C por 24 horas e depois cultivados em ágar sangue.

Os animais que sobreviveram ao seguimento de 15 dias foram eutanasiados com a administração endovenosa de cloridrato de ketamina na dosagem de 50 mg/Kg e xilazina na dosagem de 10 mg/Kg e depois submetidos ao mesmo inventário de cavidades e ao mesmo protocolo de hemocultura descrito anteriormente.

A estratificação de morbimortalidade dos animais foi realizada através de um escore validado da seguinte forma:

Escore	Estratificação
0	animais que morreram de choque séptico nas primeiras 24 horas após indução da peritonite fecal
1	animais que morreram entre 24 e 48 horas após a indução da peritonite
2	animais que morreram entre 48 horas e oito dias após a indução da peritonite, com sinais clínicos óbvios de infecção grave
3	animais que morreram entre o 8º e o 15º dia após a indução da peritonite, com sinais clínicos óbvios de infecção grave
4	animais que sobreviveram até o 15º dia, mas ainda apresentam hemocultura positiva, com sinais clínicos moderados de infecção e, após a eutanásia, apresentam abscessos dentro das cavidades torácica e abdominal
5	animais que sobreviveram até o 15º dia após a indução da peritonite e ainda apresentam hemocultura positiva, sem sinais clínicos de infecção, mas, após a eutanásia, exibem abscessos dentro das cavidades torácica e abdominal
6	animais que sobreviveram até o 15º dia após a indução da peritonite fecal e ainda têm hemocultura positiva, sem sinais clínicos de infecção, e após a eutanásia abscessos são observados apenas na cavidade abdominal
7	animais que sobreviveram até o 15º dia após a indução da peritonite fecal, mas com hemocultura negativa. Não apresentam sinais clínicos de infecção e, após a eutanásia, abscessos são observados dentro das cavidades abdominal e torácica
8	animais que sobreviveram até o 15º dia após a indução da peritonite fecal, apresentam hemocultura negativa, e após a eutanásia abscessos são observados apenas na cavidade abdominal
9	animais que sobreviveram até o 15º dia após a indução da peritonite fecal, apresentam hemocultura negativa, e após a eutanásia apenas um único e pequeno abscesso é observado na cavidade abdominal
10	animais que sobreviveram até o 15º dia após a indução da peritonite fecal, apresentam hemocultura negativa, e após a eutanásia nenhum abscesso cavitário é observado

Fonte: Autor

3.4.2 Procedimentos analíticos

As variáveis quantitativas foram expressas por suas médias e desvios padrão. As variáveis qualitativas foram expressas por suas frequências absolutas e relativas. Para a comparação dos pesos dos animais nos três grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA). O pós-teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para avaliar possível diferença grupo a grupo. O teste de Kruskal Wallis foi aplicado para avaliar possível diferença entre os escores de morbidade e mortalidade nos três grupos. Depois foi utilizado o pós-teste de Dunn para avaliar possível diferença grupo a grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graphpad Prism versão 7. Foi estabelecido o valor de $p < 0,05$ para rejeição da hipótese de nulidade.

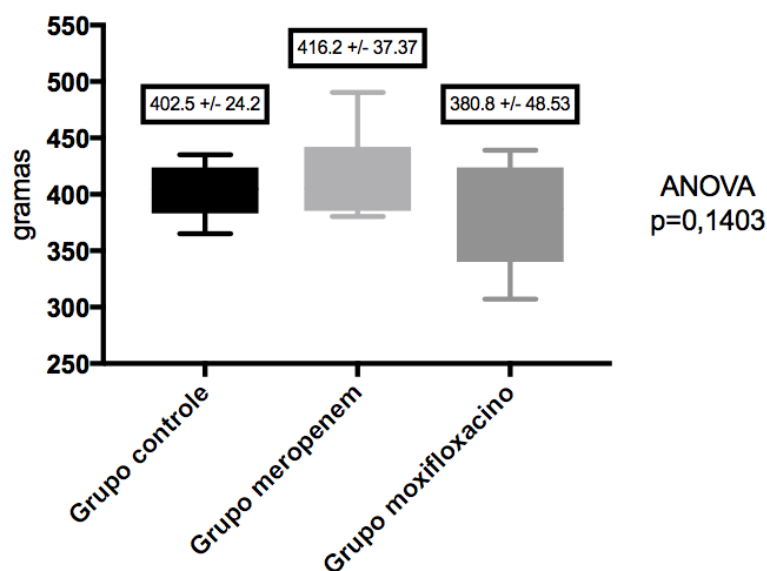
3.4.3 Procedimentos éticos

Os ratos receberam cuidados em concordância com os “Princípios de cuidados com animais de laboratório”, respeitando-se os “Princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (Cobea).¹³⁹ O projeto de investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/CESED) – protocolo número 65200420116 (ANEXO B).

4 RESULTADOS

Os animais apresentaram pesos semelhantes antes da indução da peritonite entre os grupos controle, meropenem e moxifloxacino com médias de $402,5 \pm 24,2$, $416,2 \pm 37,4$ e $380,8 \pm 48,5$ respectivamente, apontando para uma semelhança entre os grupos (Figura 5). A diferença entre o peso inicial e o final pode ser observada na tabela 1.

Figura 5 - Pesos dos animais antes da indução



Fonte: Autor

Tabela 1 - Médias dos pesos dos animais (em gramas) entre o início e o fim do seguimento

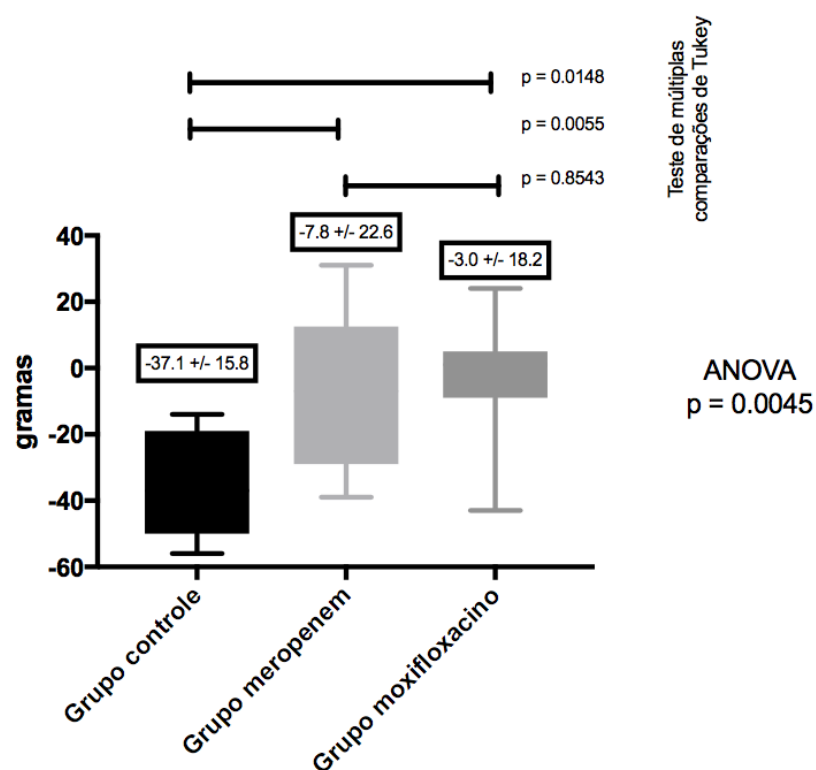
Seguimento	Grupos		
	Controle	Meropenem	Moxifloxacino
Início (D 0)	402,5	416,2	380,8
Término (D 15)	368,9	408,4	385,3

D 0 = dia da indução da peritonite; D 15 = décimo quinto dia de seguimento.

A perda de peso foi significativamente mais pronunciada no grupo controle com relação aos outros dois grupos (meropenem e moxifloxacino) que não diferiram entre si (Figura 6).

Houve três óbitos no grupo controle, nenhum no grupo meropenem e um no grupo moxifloxacino.

Figura 6 - Evolução do peso dos animais durante o seguimento



Fonte: Autor

Os achados dos inventários das cavidades foram bastante diversos, tendo sido observados peritonite difusa, abscessos bloqueados únicos e múltiplos, bloqueados e rotos, localizados tanto no abdome quanto nos pulmões (Figura 7).

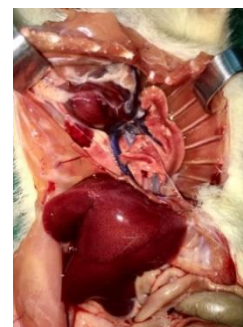
Figura 7 - Achados ilustrativos dos inventários das cavidades torácica e abdominal



Abscesso roto abdominal
(rato 1 – grupo controle)



Abscesso bloqueado abdominal
(rato 2 – grupo controle)



Abscesso pulmonar
(rato 3 – grupo controle)



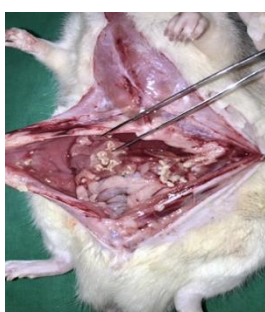
Peritonite difusa
(rato 4 – grupo controle)



Abscessos renais
(rato 5 – grupo controle)



Abscesso hepático único
(rato 8 – grupo controle)



Múltiplos abscessos
(rato 10 – grupo controle)



Cavidade abdominal sem
alterações
(rato 3 – grupo meropenem)



Abscesso bloqueado
intrabdominal
(rato 4 – grupo moxifloxacino)

Fonte: Autor

Na tabela 2 estão descritos os achados dos inventários das cavidades abdominal e torácica de cada animal.

Tabela 2 - Achados da necropsia de cada animal

Ratos	Grupos		
	Controle	Meropenem	Moxifloxacino
1	Abscessos na cavidade abdominal e torácica	Nenhum abscesso	Abscessos na cavidade abdominal e torácica
2	Abscessos apenas na cavidade abdominal	Abscessos apenas na cavidade abdominal	Nenhum abscesso
3	Abscessos na cavidade abdominal e torácica	Nenhum abscesso	Nenhum abscesso
4	Peritonite difusa	Nenhum abscesso	Abscessos apenas na cavidade abdominal
5	Abscessos na cavidade abdominal e torácica	Abscessos na cavidade abdominal e torácica	Nenhum abscesso
6	Abscessos na cavidade abdominal e torácica	Nenhum abscesso	Abscessos apenas na cavidade abdominal
7	Abscessos na cavidade abdominal e torácica	Abscesso apenas na cavidade abdominal	Abscessos na cavidade abdominal e torácica
8	Abscesso hepático único	Nenhum abscesso	Abscessos apenas na cavidade abdominal
9	Abscessos na cavidade abdominal e torácica	Abscessos apenas na cavidade abdominal	Abscessos apenas na cavidade abdominal
10	Múltiplos abscessos	Abscessos apenas na cavidade abdominal	Abscessos apenas na cavidade abdominal

Todos os animais do grupo controle apresentaram hemoculturas positivas. Naqueles submetidos ao meropenem apenas dois tiveram hemoculturas positivas e no grupo moxifloxacino houve 4 hemoculturas positivas. Alguns resultados como *Staphylococcus* e *Streptococcus* sugerem contaminação da coleta.

Tabela 3 - Resultados das hemoculturas ao fim do seguimento

Ratos	Grupos								
	Controle			Meropenem			Moxifloxacino		
	Resultado	1	2	Resultado	1	2	Resultado	1	2
1	Positivo	<i>Escherichia coli</i>		Negativo			Positivo	<i>Streptococcus viridans</i>	
2	Positivo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Positivo	<i>Streptococcus viridans</i>		Negativo		
3	Positivo	<i>Escherichia coli</i>		Negativo			Negativo		
4	Positivo	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Negativo			Negativo		
5	Positivo	<i>Escherichia coli</i>		Negativo			Negativo		
6	Positivo	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negativo			Negativo		
7	Positivo	<i>Escherichia coli</i>		Negativo			Negativo		
8	Positivo	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negativo			Positivo	<i>Escherichia coli</i>	
9	Positivo	<i>Escherichia coli</i>		Positivo	<i>Escherichia coli</i>		Positivo	<i>Escherichia coli</i>	
10	Positivo	<i>Escherichia coli</i>		Negativo			Positivo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Na tabela 4 observam-se os escores de morbimortalidade alcançados ao final do seguimento de cada grupo.

Tabela 4 - Escores de morbimortalidade

Grupos					
Controle		Meropenem		Moxifloxacino	
Rato	Escore	Rato	Escore	Número	Escore
1	4	1	10	1	4
2	6	2	6	2	10
3	4	3	10	3	10
4*	2	4	10	4	8
5	4	5	7	5	10
6	4	6	10	6	8
7	4	7	8	7*	2
8*	2	8	10	8	6
9	4	9	6	9	6
10*	2	10	8	10	6

* Animais que morreram antes do fim do seguimento de 15 dias.

A análise dos escores de morbimortalidade através do teste de Kruskal-Wallis mostrou que houve alguma diferença entre os grupos com $p = 0,003$. Após a utilização do teste de múltiplas comparações de Dunn, observou-se que a diferença foi significativa entre o grupo controle e os grupos de intervenção. Não houve diferença entre os escores alcançados pelo grupo meropenem e o grupo moxifloxacino – $p = 0,6967$ (Figura 8).

5 DISCUSSÃO

Este estudo trouxe de maneira pioneira uma análise comparativa de duas estratégias de tratamento de sepse grave numa população de animais idosos. A efetividade da indução de sepse pôde ser constatada uma vez que todos os animais que não foram submetidos a nenhuma intervenção antimicrobiana apresentaram hemoculturas positivas e elevada taxa de mortalidade.

Quando comparadas ao grupo controle, as duas intervenções se mostraram superiores e não distintas entre si segundo um escore já previamente utilizado noutros estudos.^{139,141} Houve efetividade bacteriológica bem como na redução da extensão e gravidade da infecção tanto do meropenem como da moxifloxacina.

Existem duas importantes limitações deste estudo: a não determinação do cálculo do tamanho amostral e a falta da randomização entre os três grupos de animais. Para experimentos que têm por objetivo determinar diferenças quantitativas entre grupos ou terapias, um cálculo a priori do tamanho da amostra é recomendado para evitar erros do tipo II. Erros tipo II ocorrem quando o experimento tem poder insuficiente para detectar uma diferença entre diferentes intervenções.^{142,143} Em outras palavras, o experimento pode não conseguir rejeitar a hipótese de nulidade sendo esta a falsa, o que não ocorreu neste estudo onde a hipótese de nulidade foi afastada. Houve sim diferença entre os grupos.

Embora os pesos semelhantes dos animais sinalizem para certa homogeneidade dentro dos grupos amostrais, eles não foram devidamente randomizados. Embora desnecessário, este é um erro bastante comum em estudos experimentais. No ano de 2009 um grupo de pesquisadores ingleses realizou uma análise das 271 mais importantes revistas científicas do mundo em pesquisa experimental. Eles observaram que em 87% dos artigos não havia relato de randomização dos animais.⁹ Esse mesmo grupo de pesquisadores publicou no ano seguinte um documento que pode funcionar como uma espécie de diretriz para a condução de estudos experimentais – ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*).¹⁴⁴ Ele funciona de maneira semelhante ao CONSORT para os ensaios clínicos.¹⁴⁵ As diretrizes do ARRIVE consistem em uma lista de 20 itens descrevendo as informações mínimas que todas as publicações científicas que relatam pesquisas usando animais devem incluir, como o número e características específicas dos animais usados (incluindo espécie, linhagem, sexo e antecedentes

genéticos), detalhes de alojamento e os métodos experimentais, estatísticos e analíticos (incluindo detalhes dos métodos usados para reduzir o viés, como randomização e cegamento).¹⁴⁴

Outro ponto que merece crítica é a falta de um melhor controle dos sinais clínicos de sepse como frequência cardíaca, respiratória e pressão arterial. Isso faz com que a gravidade do quadro séptico seja negligenciada pelos pesquisadores. Novas ferramentas de monitorização, à semelhança do que se faz numa unidade de terapia intensiva, poderão ser assimilados na vigilância dos animais.¹⁴⁶ O uso de animais de um mesmo sexo também é motivo de ponderação haja vista que homens e mulheres respondem de maneira diferente ao insulto infeccioso.¹⁴⁷ Por fim, a falta de administração de fluidos de ressuscitação, conduta já consolidada na prática clínica, distancia esse experimento do manejo habitual de pacientes com sepse.^{2,6,20,148}

A despeito de a maioria dos casos de sepse em humanos ocorrerem em idosos, os modelos experimentais ou omitem a idade dos animais ou utilizam animais jovens e sem comorbidades, tornando inapropriado extrapolar os resultados encontrados para o mundo real.¹⁴⁹

Embora o uso de modelos experimentais em sepse tenha importante papel no seu entendimento, dezenas de intervenções como corticoides, anticorpos anticitocinas e antitrombina III que foram conduzidos com sucesso em pesquisas experimentais falharam em ensaios clínicos.^{150,151} Enxerga-se nítida dissociação entre a pesquisa básica e a pesquisa clínica.

As questões que envolvem o tratamento da sepse ainda estão longe de ser completamente respondidas. Se os estudos mais antigos, observacionais sobretudo, pareciam apontar que o tratamento com esquemas antimicrobianos combinados parecia mais efetivo, evidências mais recentes sugerem que esquemas em monoterapia podem ser tão efetivo e menos tóxico do que os esquemas combinados em pacientes imunocompetentes.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Dois grandes estudos multicêntricos não demonstraram superioridade de uma terapia combinada de meropenem mais uma fluoroquinolona (ciprofloxacina ou moxifloxacina) a um meropenem em monoterapia como terapia empírica para suspeita de pneumonia associada à ventilação mecânica ou sepse grave.^{155,156}

No momento, existem várias novas e promissoras abordagens para o tratamento da sepse. Dentre essas estratégias de tratamento destacam-se novas

vacinas^{157,158}, anticorpos monoclonais contra patógenos microbianos¹⁵⁸ e abordagens que envolvem imunometabolismo.¹⁶⁰

Embora o tratamento dos pacientes com sepse tenha melhorado muito nos últimos anos¹⁶¹, inúmeras terapias testadas com bons resultados em modelos animais falharam em dezenas de ensaios clínicos.^{149,162–164} É mais provável que a melhora no prognóstico da sepse se deva a um maior reconhecimento e uma intervenção mais precoce pelos serviços de saúde e pela publicação e adoção das normas ditadas nas diretrizes.^{165,166}

A incapacidade de se poder fazer a translação do conhecimento adquirido em pesquisas experimentais para os ensaios clínicos, no entanto, não deve ditar o epitáfio da pesquisa básica. De outra forma, deve desafiar os grupos de pesquisa a criar modelos que mimetizem melhor as respostas humanas aos agravos infecciosos. Neste sentido o desenvolvimento dos chamados “ratos humanizados” parece ser modelo promissor onde células-tronco hematopoiéticas são transplantadas para os ratos que adquirem um sistema imunológico funcional semelhante ao humano e podem representar uma ferramenta próspera para a pesquisa translacional, pois podem permitir a adequada modelagem para as mais diferentes doenças humanas *in vivo*.^{167–169} Até o presente momento, os dados obtidos ainda são limitados.

6 CONCLUSÃO

Meropenem e moxifloxacina se mostraram estratégias efetivas para tratamento de sepse de origem abdominal em ratos idosos. A elevada mortalidade encontrada em ratos do grupo controle e a presença universal de hemoculturas positivas ao fim do seguimento deste grupo permitem inferir que este é um modelo eficaz em induzir quadro de peritonite neste grupo etário.

REFERÊNCIAS

1. Agostinho. *A vida feliz*. Col. Patrística, 11. São Paulo: Paulus, cap. 2, par.11, p .130, 1998.
2. Cawcutt, K. A.; Peters, S. G. Severe sepsis and septic shock: clinical overview and update on management. *Mayo Clin Proc*, v.89, n. 11, p. 1572-1578, 2014.
3. Accardi, G.; Caruso, C. Immune-inflammatory responses in the elderly: an update. *Immun Ageing*, v.15, n.1, p.11-14, 2018.
4. Martín, S.; Pérez, A.; Aldecoa, C. Sepsis and immunosenescence in the elderly patient: a review. *Front Med*, v. 4, n.20, 2017.
5. Yoshikawa, T. T. Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases. *Clin Infect Dis*, v. 30, n. 6, p. 931-933, 2000.
6. Clifford, K. M. et al. Challenges with diagnosing and managing sepsis in older adults. *Expert Rev Anti Infect Ther*, v. 14, n.2, p. 231-241, 2016.
7. Banerjee, D.; Opal, S. M. Age, exercise, and the outcome of sepsis. *Crit Care*, v. 21, n.1, p. 286, 2017.
8. Mitchell, S. J. et al. Animal models of aging research: implications for human aging and age-related diseases. *Annu Rev Anim Biosci*, v.3, p.283-303, 2015.
9. Kilkenny, C. et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS One*, v. 4, n. 11, p.e7824, 2009.
10. Majno, G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J Infect Dis*, v.163, n.5, p.937-945, 1991.
11. Fleischmann, C. et al. International Forum of Acute Care Trialists. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*, v.193, n.3, p.259-272, 2016.
12. Iwashyna, T. J. et al. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans. *J Am Geriatr Soc*, v.60, n.6, p.1070-1077, 2012.
13. Gaieski, D. F. et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*, v.41, n.5, p.1167-1174, 2013.
14. Vincent, J. L. et al. ICON Investigators. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med*, v.2, n.5, p.380-386, 2014.

15. Fargo, E. L. et al. Impact of electronic physician order-set on antibiotic ordering time in septic patients in the emergency department. *Appl Clin Inform*, v. 9, p. 4, p. 869-874, 2018.
16. Martin, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, v. 348, p.1546-1554, 2003.
17. Denstaedt, S. J.; Singer, B. H.; Standiford, T. J. Sepsis and nosocomial infection: patient characteristics, mechanisms, and modulation. *Front Immunol*, v. 9, n.1, p. 2446, 2018.
18. Torio, C. M.; Andrews, R. M. *National inpatient hospital costs: the most expensive conditions by payer, 2011*. Statistical Brief #160. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs; 2013.
19. Cohen, J. et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis*, 2015;15(5):581-614.
20. Kim, H. I.; Park, S. Sepsis: Early Recognition and Optimized Treatment. *Tuberc Respir Dis*, v.81, n.1, p.e39, 2018.
21. Seymour, C. W. et al. Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis. *N Engl J Med*, v.376, p.2235-2244, 2017.
22. Iwashyna, T. J. et al. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*, v.304, n.16, p.1787-1794, 2010.
23. König, C. et al. What matters most to sepsis survivors: a qualitative analysis to identify specific health-related quality of life domains. *Qual Life Res*, v. 28, n. 3, p. 637-647, 2019.
24. Jackson, J. C. et al. The association between delirium and cognitive decline: a review of the empirical literature. *Neuropsychol Rev*, v.14, n.2, p. 87-98, 2004.
25. Calsavara, A. J. C. et al. Post-sepsis cognitive impairment and associated risk factors: A systematic review. *Aust Crit Care*, v.31, n. 4, p. 242-253, 2018.
26. Girard, T. D. et al. Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness. *Crit Care Med*, v. 38, n. 7, p.1513-1520, 2010.
27. Tsertsvadze, A. et al. Community-onset sepsis and its public health burden: a systematic review. *Syst Rev*, v. 5, n. 1, p.81, 2016.
28. Shankar-Hari, M.; Phillips GS, Levy ML. Sepsis definitions task force. Developing a new Definition and assessing new clinical criteria for septic shock: For the third international consensus definitions for sepsis and septic. *Shock*, v. 315, n. 8, p. 775-787, 2016.

29. Jolley, R. J. et al. Validity of administrative data in recording sepsis: a systematic review. *Crit Care*, v.19, n. 1, p.139-141, 2015.
30. Beesley, S. J. Lanspa, M. J. Why we need a new definition of sepsis. *Ann Transl Med*, v.3, p.296-301, 2015.
31. Singer, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, v. 315, p.801-810, 2016.
32. Ziesmann, M. T.; Marshall, J. C. Multiple Organ Dysfunction: The Defining Syndrome of Sepsis. *Surg Infect*, v.19, n. 2, p.184-190, 2018.
33. Zampieri, F. G.; Mazza, B. Mechanical ventilation in sepsis: A reappraisal. *Shock*, v. 47, suppl. 1, p. 41-46, 2017.
34. Bellomo, R. et al. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med*, v.43, n. 6, p. 816-828, 2017.
35. Zhang, Y. et al. Additional traditional Chinese medicine on gastrointestinal dysfunction in patients with sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Pak J Pharm Sci*, v.29, suppl. 1, p. 663-669, 2016.
36. Yan, J.; Li, S.; Li, S. The role of the liver in sepsis. *Int Rev Immunol*, v. 33, n. 6, p. 498-510, 2014.
37. Simmons, J.; Pittet, J. F. The coagulopathy of acute sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol*, v. 28, n. 2, p. 227-236, 2015.
38. Gupta, T. et al. Sequential organ failure assessment component score prediction of in-hospital mortality from sepsis. *J Intensive Care Med*, 30:885066618795400, 2018.
39. Mochizuki, K. et al. Early changes in the sequential organ failure assessment score among patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost*, v. 24, suppl. 9, p. 332S-339S, 2018.
40. Zhang, Y.; Khalid, S.; Jiang, L. Diagnostic and predictive performance of biomarkers in patients with sepsis in an intensive care unit. *J Int Med Res*, v. 47, n. 1, p. 44-58, 2019.
41. Tan, T. L. et al. Comparison of prognostic accuracy of the quick Sepsis-Related Organ Failure Assessment between short-&long-term mortality in patients presenting outside of the intensive care unit - A systematic review & metaanalysis. *Sci Rep*, v. 8, n. 1, p.16698, 2018.

42. Haas, S. A. et al. Severe hyperlactatemia, lactate clearance and mortality in unselected critically ill patients. *Intensive Care Med*, v. 42, n. 2, p.202-210, 2016.
43. Chung, K. P. et al. Increased plasma acetylcarnitine in sepsis is associated with multiple organ dysfunction and mortality: A multicenter cohort study. *Crit Care Med*, 2018.
44. Osborn, T. M. Severe sepsis and septic shock trials (ProCESS, ARISE, ProMISe): What is optimal resuscitation? *Crit Care Clin*, v. 33, n. 2, p. 323-344, 2017.
45. López-Otín, C. et al. The hallmarks of aging. *Cell*, v.153, p. 6, p. 1194-1217, 2013.
46. Opal, S. M.; Girard, T.; Ely, E. W. The immunopathogenesis of sepsis in the elderly. *Clin Infect Dis*, v. 41, p. S504-12, 2005.
47. Reichard, M. Evolutionary perspectives on ageing. *Semin Cell Dev Biol*, v. 70, p. 99-107, 2017.
48. Kirkwood, T. B. L. Austad SN. Why do we age? *Nature*, v. 408, p. 233-238, 2000.
49. Cui, H.; Kong, Y.; Zhang. H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and aging. *J Signal Transduct*, p.1-13, 2012.
50. Shaw, A. C. et al. Dysregulation of human toll-like receptor function in aging. *Ageing Res Rev*, v. 10, n. 3, p. 346-353, 2011.
51. Hazeldine, J.; Arlt, W.; Lord, J. M. Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.120, n. 2-3, p.127-136, 2010.
52. Alonso-Fernández, P.; De la Fuente, M. Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci*, v. 4, n. 2, p. 78-100, 2011.
53. Franceschi, C. et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 128, n. 1, p. 92-105, 2007.
54. Agarwal, S.; Busse, P. J. Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol*, v. 104, n. 3, p. 183-190, 2010.
55. Shaw, A. C. et al. Aging of the innate immune system. *Cur Opin Immunol*, v. 22, n. 4, p. 507-513, 2010.

56. Biron, C. A. et al. More things in heaven and earth: defining innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, v.11, p.1080-1082, 2010.
57. Ostan, R. et al. Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation*, v.15, n. 4-6, p. 224-240, 2008.
58. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loeben B. The aging of the immune system. *Transpl Int*, v. 22, n. 1, p. 1041-1050, 2009.
59. Ribizzi, G. et al. Cytokine polymorphisms and Alzheimer disease: possible associations. *Neurol Sci*, v. 31, n. 3, p. 321-325, 2010.
60. Ongrádi, J. Kövesdi, V. Factors that may impact on immunosenescence: an appraisal. *Immun Ageing*, v.7:7, 2010.
61. Naylor, K. et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol*, v. 174, n. 11, p.7446-5742, 2005.
62. Mocchegiani E. et al. NK and NKT cells in aging and longevity: role of zinc and metallothioneins. *J Clin Immunol*, v.29, n. 1, p.416-425, 2009.
63. Caruso, C. et al. Mechanisms of immunosenescence. *Immun Ageing*, v. 6, n. 10, p. 1-4, 2009.
64. Franceschi, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, v. 908, n.1, p.244-2454, 2000.
65. Puzianowska-Kuźnicka, M. et al. Interleukin-6 and C-reactive protein, successful aging, and mortality: the PolSenior study. *Immun Ageing*, v. 13, n. 1, p.21-23, 2016.
66. Valiathan, R. et al. Effects of ageing on the immune system: infants to elderly. *Scand J Immunol*, v. 83, n. 4, p. 255-266, 2016.
67. Pawelec, G.; Goldeck, D, Derhovanessian E. Inflammation, ageing and chronic disease. *Curr Opin Immunol*, v. 29, n. 1, p23-28, 2014.
68. Biagi, E. et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*, v. 5, n. 5, p.e10667, 2010.
69. Simanek, A. M. et al. Seropositivity to cytomegalovirus, inflammation, all-cause and cardiovascular disease-related mortality in the United States. *PLoS One*, v. 6, n. 2, p.e16103, 2011.
70. Brinkley, T. E. et al. Total and abdominal adiposity are associated with inflammation in older adults using a factor analysis approach. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 67, n. 10, p.1099-1106, 2012.

71. Xu, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, v.112, n. 12, p.1821-1830, 2003.
72. Vasan, R. S. et al. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation*, v. 107, n. 11, p. 1486-1491, 2003.
73. Hurez, V. et al. Considerations for successful cancer immunotherapy in aged hosts. *Exp Gerontol*, v. 107, n. 1, p. 27-36, 2018.
74. Hoos, A. Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov*, v.15, n. 4, p. 235-247, 2016.
75. Sartelli, M. A focus on intra-abdominal infections. *World J Emerg Surg*, v.5, n.9, p.3-6, 2010.
76. Blot S, De Waele, J. J. Critical issues in the clinical management of complicated intra-abdominal infections. *Drugs*, v. 65, n. 1, p.1611–1620, 2005.
77. Doklestić SK, et al. Secondary peritonitis - evaluation of 204 cases and literature review. *J Med Life*, v. 7, n. 2, p. 132-138, 2014.
78. Mishra SP, Tiwary SK, Mishra M, Gupta SK. An introduction of tertiary peritonitis. *J Emerg Trauma Shock*, v. 7, n. 2, p. 121-123, 2014.
79. Montravers, P. et al. Dynamic changes of microbial flora and therapeutic consequences in persistent peritonitis. *Crit Care*, v.19, n. 1, p.70-73, 2015.
80. Lamme, B. et al. Clinical predictors of ongoing infection in secondary peritonitis: systematic review. *World J Surg*, v. 30, n. 1, p. 2170-2181, 2006
81. Emmi, V.; Sganga, G. Diagnosis of intra-abdominal infections: clinical findings and imaging. *Infez Med*, v. 16, suppl 1, p.19-30, 2008.
82. Emmi, V.; Sganga, G. Clinical diagnosis of intra-abdominal infections. *J Chemother*, v. 21, suppl. 1, p. 12-18, 2009.
83. Hao, W. L.; Lee, Y. K. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol Biol*, v. 268, n. 1, p. 491-502, 2004.
84. O'Toole, P. W.; Jeffery, I. B. Gut microbiota and aging. *Science*, v. 350, n. 6265, p. 1214-1215, 2015.
85. Marshall, J. C. Intra-abdominal infections. *Microbes Infect*, v. 6, n. 11, p. 1015-1025, 2004.

86. Babinchak, T. et al. Trends in susceptibility of selected Gram-negative bacilli isolated from intra-abdominal infections in North America: SMART 2005-2010. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 76, p. 379-381, 2013.
87. Sartelli, M. et al. Complicated intra-abdominal infections worldwide: the definitive data of the CIAOW Study. *World J Emerg Surg*, v. 9, n. 37, p. 1-10, 2014.
88. Brook, I. Microbiology of polymicrobial abscesses and implications for therapy. *J Antimicrob Chemother*, v. 50, p. 805-810, 2002.
89. Goldstein, E. J. C.; Snyderman, D. R. Intra-abdominal infections: review of the bacteriology, antimicrobial susceptibility and the role of ertapenem in their therapy. *J Antimicrob Chemother*, v. 53, n.1, p. 29-36, 2004.
90. Lee, Y. R. et al. Complicated intra-abdominal infections: the old antimicrobials and the new players. *Drugs*, v. 75, n. 18, p. 2097-2117, 2015.
91. Goldstein, E. J. C. Intra-abdominal anaerobic infections: bacteriology and therapeutic potential of newer antimicrobial carbapenem, fluoroquinolone, and desfluoroquinolone therapeutic agents. *Clin Infect Dis*, v. 35, n. suppl 1, p.S106-11, 2002.
92. Roehrborn, A. et al. The microbiology of postoperative peritonitis. *Clin Infect Dis*, v. 33, n. 9, p. 1513-1519, 2003.
93. Bassetti, M. et al. A multicenter multinational study of abdominal candidiasis: epidemiology, outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med*, v. 41, p. 1601-1610, 2015.
94. Steinbach, C. L. et al. Spectrum adequacy of antibiotic regimens for secondary peritonitis: a retrospective analysis in intermediate and intensive care unit patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, v. 14, n. 1, p. 48, 2015.
95. Petersen, M. W. et al. Untargeted antifungal therapy in adult patients with complicated intra-abdominal infection: a systematic review. *Acta Anaesthesiol Scand*, v. 62, n. 1, p. 6-18, 2018.
96. Hasibeder, W.; Halabi, M. Candida peritonitis. *Minerva Anesthesiol*, v. 80, n. 4, p. 470-481, 2014.
97. Ordoñez, C. A.; Puyana, J. C. Management of peritonitis in the critically ill patient. *Surg Clin North Am*, v. 86, n. 1, p.1323-1349, 2006.
98. Ross, J. T.; Matthay, M. A.; Harris, H. W. Secondary peritonitis: principles of diagnosis and intervention. *BMJ*, v. 361, p.k1407, 2018.

99. Solomkin, J. S. et al. Guidelines for the selection of antiinfective agents for intra-abdominal infections. *Clin Infect Dis*, v. 37, p.997-1005, 2003.
100. Mazuski, J. E. et al. The Surgical Infection Society guidelines on antimicrobial therapy for intra-abdominal infections: an executive summary. *Surg Infect*, v. 3, n. 3, p. 161–173, 2002.
101. Bush, K.; Jacoby, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.
102. Kioumis, I. P.; Kuti, J. L.; Nicolau, D. P. Intra-abdominal infections: considerations for the use of the carbapenems. *Expert Opin Pharmacother*, v. 8, n. 2, p. 167-182, 2007.
103. Powell, L. L.; Wilson, S. E. The role of beta-lactam antimicrobials as single agents in treatment of intra-abdominal infection. *Surg Infect*, v. 1, p. 1, p. 5763, 2000.
104. Fiore, M. et al. Are third-generation cephalosporins still the empirical antibiotic treatment of community-acquired spontaneous bacterial peritonitis? A systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 30, n. 3, p. 329-336, 2018.
105. Barker, C. I.; Germovsek, E.; Sharland, M. What do I need to know about penicillin antibiotics? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, v. 102, n. 1, p. 44-50, 2017.
106. Peleg, A. Y.; Hooper, D. C. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *N Engl J Med*, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, 2010.
107. Haeseker, M. et al. Is the standard dose of amoxicillin-clavulanic acid sufficient? *BMC Pharmacol Toxicol*, v. 15, n. 38, p. 1-8, 2014.
108. Ball, P. The clinical development and launch of amoxicillin/clavulanate for the treatment of a range of community-acquired infections. *Int J Antimicrob Agents*, v.30, suppl. 2, p.S113-117, 2007.
109. Jackson, M. A. Schutze, G. E. The use of systemic and topical fluoroquinolones. *Pediatrics*, v.138, n. 5, p. 1-7, 2016.
110. Miravittles M, Anzueto A. Moxifloxacin: a respiratory fluoro-quinolone. *Expert Opin Pharmacother*, v.9, n. 10, p.1755-1772, 2008.
111. Zhang, G. F. et al. Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem*, v.146, n. 1, p.599-612, 2018.
112. Butler, M. S. et al. Glycopeptide antibiotics: back to the future. *J Antibiot*, v.67, n. 9, p.631-644, 2014.

113. Solomkin, J. S. et al. Diagnosis and management of complicated intraabdominal infection in adults and children. *Surg Infect*, v. 11, n.1, p.79-109, 2010.
114. Moreno, R. P.; Nassar, A. P. Jr. Is APACHE II a useful tool for clinical research? *Rev Bras Ter Intensiva*, v. 29, n. 3, p. 264-267, 2017.
115. Chow, A. W. et al. Canadian practice guidelines for surgical intra-abdominal infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, v. 21, n. 1, p. 11-37, 2010.
116. Solomkin, J. S. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Surg Infect*, v. 11, n. 1, p. 79-109, 2010.
117. Rae, N. et al. MRSA: treating people with infection. *BMJ Clin Evid*, v.16, pii: 0922, 2016. 117.
118. Djulbegovic, B.; Guyatt, G. H. Progress in evidence-based medicine: a quarter century on. *Lancet*, v. 390, n. 10092, p. 415-423, 2017.
119. Guyatt, G. Evidence-based medicine. *ACP J Club. Ann Intern Med*, v.114, suppl 2, p. A-16, 1991.
120. Sackett, D. L. How to read clinical journals, I: why to read them and how to start reading them critically. *CMAJ*, v. 124, n. 5, p. 555-558, 1981.
121. Djulbegovic, B.; Guyatt, G. H.; Ashcroft, R.E. Epistemologic inquiries in evidence-based medicine. *Cancer Control*, v.16, n. 1, p.158-168, 2009.
122. Macleod, M. R. et al. Biomedical research: increasing value, reducing waste. *Lancet*, v. 383, p. 101-104, 2014.
123. Rossouw, J. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: 50 principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*, v. 288, n. 3, p. 321-333, 2002.
124. Teo, K. K.; Yusuf, S.; Furberg, C. D. Effects of prophylactic antiarrhythmic drug therapy in acute myocardial infarction. An overview of results from randomized controlled trials. *JAMA*, v. 270, n. 13, p. 1589-1595, 1993.
125. Atkins, D. et al. Grading quality of evidence and 52 strength of recommendations. *BMJ*, v.328, n. 1, p.1490, 2004.
126. Atkins, D. et al. Systems for grading the quality of evidence and the strength of recommendations I: critical appraisal of existing approaches The GRADE Working Group. *BMC Health Serv Res*, v.4, 38, p. 1-8, 2004.

127. Guyatt, G. H. GRADE Working Group. GRADE: Going from evidence to recommendations. *BMJ*, v. 336, n. 7652, p. 1049-1051, 2008.
128. Hargraves, I. et al. Shared decision making: the need for patient-clinician conversation, not just information. *Health Aff*, v. 35, p. 627-629, 2016.
129. Petrini C. From bench to bedside and to health policies: ethics in translational research. *Clin Ter*, v. 162, n. 1, p. 51-59, 2011.
130. Gelfond, J. A. et al. Principles for the ethical analysis of clinical and translational research. *Stat Med*, v. 30, n. 23, p. 2785-2792, 2011.
131. Zoellner, J. et al. What is translational research? Concepts and applications in nutrition and dietetics. *J Acad Nutr Diet*, v. 115, n. 7, p. 1057-1071, 2015.
132. Slack, M. K.; Draugalis, J. R. Establishing the internal and external validity of experimental studies. *Am J Health Syst Pharm*, v. 58, n. 22, p. 2173-2181, 2001.
133. Glasgow, R. E. et al. The future of health behavior change research: What is needed to improve translation of research into health promotion practice? *Ann Behav Med*, v. 27, n. 1, p. 3-12, 2004.
134. Curran, G. M. et al. Effectiveness - implementation hybrid designs: Combining elements of clinical effectiveness and implementation research to enhance public health impact. *Med Care*, v. 50, n. 3, p. 217-226, 2012.
135. Zerhouni, E. A. Translational and clinical science - time for a new vision. *N Engl J Med*, v. 353, n. 1, p. 1621-1623, 2005.
136. Drolet, B. C.; Lorenzi, N. M. Translational research: understanding the continuum from bench to bedside. *Transl Res*, v. 157, n. 1, p. 1-5, 2011.
137. Graham, I. D.; Tetroe, J. Nomenclature in translational research. *JAMA*, v. 299, n. 18, p. 2149-2150, 2008.
138. Fiscella, K.; Bennett, N. M. Szilagyi P. G. Nomenclature in translational research. *JAMA*, v. 299, n. 18, p. 2148-2149, 2008.
139. Mascena, G. V. et al. Severe autogenously fecal peritonitis in ageing Wistar rats. Response to intravenous meropenem. *Acta Cir Bras*, v. 29, n. 9, p. 615621, 2014.
140. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. *Princípios éticos na experimentação animal*. São Paulo: COBEA; 1991.
141. Melo, M. C. et al. Severe autogenously fecal peritonitis in Wistar rats with permanent bilateral carotid occlusion. Response to intra peritoneal moxifloxacin combined with dexamethasone. *Acta Cir Bras*, v. 29, n. 1, p.7681, 2014.

142. Szucs, D.; Ioannidis, J. P. A. When null hypothesis significance testing is unsuitable for research: a reassessment. *Front Hum Neurosci*, v. 11, n. 390, p.1-21, 2017.
143. Faggion, C. M. Jr. Animal research as a basis for clinical trials. *Eur J Oral Sci*, v. 123, n. 2, p. 61-64, 2015.
144. Kilkenney, C. et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*, v. 8, n. 6, p.e1000412, 2010.
145. Moher, D.; Schulz, K. F.; Altman, D. G. The Consort statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Lancet*, v. 357, p.1191-1194, 2001.
146. Lewis, A. J.; Rosengart, M. R. Bench-to-bedside: a translational perspective on murine models of sepsis. *Surg Infect*, v.19, n. 1, p.137-141, 2018.
147. Guidet, B.; Maury, E. Sex and severe sepsis. *Crit Care*, v. 17, n. 3, p.144-147, 2013.
148. Peake, S. L. et al. Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. *N Engl J Med*, v. 371, n.1, p.1496-1506, 2014.
149. Dyson, A.; Singer, M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med*, v. 37, suppl. 1, p.S30-7, 2009.
150. Fink, M. P. Animal models of sepsis. *Virulence*, v. 5, p. 143-153, 2014.
151. Lilley, E. et al. Refinement of animal models of sepsis and septic shock. *Shock*, v. 43, n. 4, p. 304-316, 2015.
152. Kumar, A. et al. Early combination antibiotic therapy yields improved survival compared with monotherapy in septic shock: a propensity-matched analysis. *Crit Care Med*, v. 38, n. 9, p. 1773-1785, 2010.
153. Micek, S. T. et al. Empiric combination antibiotic therapy is associated with improved outcome against sepsis due to Gram-negative bacteria: a retrospective analysis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, n. 5, p. 1742-1748, 2010.
154. Paul, M. et al. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactamaminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 1: p.1-177, 2014.

155. Heyland, D. K, et al. Randomized trial of combination versus monotherapy for the empiric treatment of suspected ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med*, v. 36, p. 737-744, 2008.
156. Brunkhorst, F. M. et al. Effect of empirical treatment with moxifloxacin and meropenem vs meropenem on sepsis-related organ dysfunction in patients with severe sepsis: a randomized trial. *JAMA*, v. 307, n. 22, p. 2390-2399, 2012.
157. Chen, Q. et al. Novel synthetic glycerolphosphate-based antistaphylococcal conjugate vaccine. *Infect Immun*, v. 81, n. 1, p. 2554-61, 2013.
158. Gregory, S. H. et al. Detoxified endotoxin vaccine (J5dLPS/OMP) protects mice against lethal respiratory challenge with *Francisella tularensis* SchuS4. *Vaccine*, v. 28, n. 1, p. 2908-2915, 2010.
159. Dinubile, M. Adjunctive treatment of severe sepsis. *Lancet Infect Dis*, v. 13, n. 1, p. 917-918, 2013.
160. Caro-Maldonado, A. et al. Matched and mismatched metabolic fuels in lymphocyte function. *Semin Immunol*, v. 24, n. 1, p. 405-413, 2012.
161. 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. 1, p. 1308-1316, 2014.
162. Annane D. Improving clinical trials in the critically ill: unique challenge-sepsis. *Crit Care Med*, v. 37, suppl 1, p. S117-28, 2009.
163. Marshall, J. C. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med*, v. 20, n. 1, p.195-203, 2014.
164. Angus, D. C. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *JAMA*. v. 306, n. 1, p.2614-2615, 2011.
165. Ferrer R, Artigas A, Levy MM, González-Díaz G, Garnacho-Montero J, Ibáñez J, et al. Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *JAMA*, v. 299, n. 1, p. 2294-303, 2008.
166. Levy, M. M. et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med*, v. 38, n. 2, p. 367-374, 2010.
167. Unsinger, J. et al. Sepsis-induced human lymphocyte apoptosis and cytokine production in “humanized” mice. *J Leukoc Biol*, v. 86, n. 1, p.219-227, 2009.

168. Herndler-Brandstetter, D. et al. Humanized mouse model supports development, function, and tissue residency of human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci*, v.114, n. 45, p.E9626-E9634, 2017.
169. Selli, M. E. et al. A humanized HLA-DR4 mouse model for autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*, v. 107, p. 22-26, 2017.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO NA ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA



7-Experimental Surgery

Fecal peritonitis in aging rat model. Therapeutic response to different antibiotic strategies¹

Guilherme Veras Mascena^I, Carlos Alberto Figueiredo Filho^{II}, Marcos Antônio Xavier de Lima Júnior^{III}, Thárcia Kiara Beserra Oliveira^{IV}, Diego Nery Benevides Gadelha^V, Maria Cecília Santos Cavalcanti Melo^V, Carlos Teixeira Brandt^{VI}

^IFellow PhD degree, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil. Acquisition and interpretation of data, manuscript writing.

^{II}Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, UFPE, Recife-PE, Brazil. Acquisition of data.

^{III}Graduate student, UNIFACISA, Campina Grande-PB, Brazil. Acquisition of data.

^{IV}Fellow PhD degree, Agricultural Engineering, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Brazil. Acquisition of data.

^VPhD, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, UFPE, Recife-PE, Brazil. Manuscript writing, critical revision.

^{VI}PhD, Head, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, UFPE, Recife-PE, Brazil. Interpretation of data, final revision.

Abstract

Purpose: To evaluate the response of aging rats with sepsis to two different antibiotic regimens.

Methods: The study was conducted with 30 aging rats (18 month-old) with autologous feces peritonitis. The animals were divided into three groups: Group 0 received no therapeutic intervention (control), while Group 1 received a single dose of 40 mg/kg meropenem and Group 2 received a single dose of 20 mg/kg moxifloxacin. The intervention in both Groups was made 6 hours after induction of peritonitis. The animals were followed up to 15 days for evaluating morbidity and mortality. The weights at baseline were similar in all groups.

Results: At the end of follow-up, weight loss was significantly greater ($p=0.0045$) in Group 0 (non-intervention controls). Culture from a blood sample at the end of follow-up was positive in all the animals in Group 0, in two animals in Group 1 and in four animals in Group 2. Morbidity/mortality was significantly higher in Group 0 compared to both Groups 1 and 2 ($p=0.003$) but the scores were not significantly different between Groups 1 and 2 ($p=0.6967$).

Conclusion: Both antibiotic regimens rendered promising results for the treatment of fecal peritonitis.

Key words: Peritonitis. Carbapenems. Quinolones. Aging. Rats.

■ Introduction

Sepsis is a severe clinical condition and a common consequence of several infectious diseases. Clinical progression is generally extremely rapid due to an underlying uncontrolled immune response that leads to multiple organ failure with high associated morbidity and mortality rates¹⁻⁴.

Populations are aging worldwide, with estimates suggesting that by 2050 more than 20% of the world's population will be at least 60 years of age⁵. This increase in life expectancy heralds a predictable increase in the incidence and severity of many diseases. To a considerable extent, this scenario is the result of the comorbidities typically found in this age group, as well as of age-related immunosenescence^{1,6,7}.

The incidence of sepsis has increased in the population in general and particularly in individuals who underwent surgery. This is especially evident in the elderly population when mortality rates are higher⁸⁻¹². Patients over 65 years of age already account for more than half of all admissions to intensive care units in the United States, with mortality rate that exceeds 30%¹³. Explanations include the increase number of invasive procedures performed, and the use of immunosuppressants and aggressive surgeries in this population⁸.

Although the focus of much research, little has changed in the management of patients with sepsis over recent decades, the information acquired from basic research has resulted in interventions that are of little or no effect at all in humans, and this may be a consequence of dissociation between the real world, in which more than 60% of the cases of sepsis occur in individuals over 60 years of age, and experimental research, where the majority of the animals studied are young^{7,14-19}.

Carbapenems and quinolones, among others, have been used to treat severe, intra-abdominal sepsis, since these are effective antibiotics against the principal etiologic agents; however, there is no clear evidence of the superiority of one regimen over the other²⁰⁻²³.

The objective of the present study was to evaluate the therapeutic response to two different antibiotic regimens in aging rats in which peritonitis was induced using autologous feces.

■ Methods

The rats were cared for in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" and the study was conducted respecting the ethical principles in animal experimentation. The animal ethics committee (CEUA/CESED) approved the study protocol under number 0022/03092012-1.

This was a prospective, analytical, experimental study with 30 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*). All the animals were adult rats of 18 months of age with no illness or disease. The animals were kept in polypropylene cages measuring 43 x 43 x 20 cm at a controlled temperature of 23 ± 1°C and 12-hour light/dark cycles. Access to food and drink was *ad libitum*, with food consisting of a nutritionally balanced rodent diet.

The animals were divided into three groups: the non-intervention control group (Group 0), the meropenem group (Group 1) and the moxifloxacin group (Group 2). On day 1 of the experiment, peritonitis was induced in all the animals using a 10% solution prepared with autogenous feces, i.e. 2 grams of feces collected from each rat were diluted and homogenized in 20 ml of 0.9% saline. All the animals in the three groups were inoculated

with their respective solution at a dose of 4 ml/kg of weight, a dose that had been confirmed as sub-lethal for that age in a previous study²⁴. In Groups 1 and 2, a therapeutic intervention was performed six hours after peritonitis was induced, with treatment consisting of a single 40-mg/kg dose of meropenem for the animals in Group 1 and a single 20-mg/kg dose of moxifloxacin for those in Group 2.

The animals' activity, weight, body temperature and respiratory rate with the aim of detecting severe infection were monitored. All the animals that died during follow-up underwent inspection of the abdominal cavity through a midline incision from the xiphoid process to the pubic symphysis. The incision was made using surgical scissors. The inspection aimed to identify abscesses, adhesions and macroscopic signs of infection such as pus in the abdominal cavity or in solid organs. At the evaluation moment, using a 30 x 1.5 mm needle, 2 ml of blood were collected from the abdominal aorta and stored into blood culture bottles. After incubation at 35 ± 2°C for 24 hours, blood agar plates were inoculated.

At day 15, the animals that had survived the entire follow-up period were euthanized by intravenous administration of 50 mg/kg ketamine hydrochloride and 10 mg/kg xylazine hydrochloride. They were then submitted to the same protocol of incision, inspection and blood culture described above.

Morbidity and mortality in the animals were stratified by applying a validated score^{24,25} based on the findings detected after the induction of fecal peritonitis:

Scores 0-3: death before day 15

0: death from septic shock in the first 24 hours;

1: death between 24 and 48 hours;
2: death between 48 hours and 8 days, with obvious clinical signs of severe infection;
3: death between 8 and 15 days, with obvious clinical signs of severe infection.

Scores 4-10: survival until day 15, followed by euthanasia

4: positive blood culture, moderate clinical signs of infection; abscesses found in the thoracic and abdominal cavities;

5: positive blood culture, no clinical signs of infection, abscesses found in the thoracic and abdominal cavities;

6: positive blood culture, no clinical signs of infection, abscesses found in the abdominal cavity alone;

7: negative blood culture, no clinical signs of infection, abscesses found in the abdominal and thoracic cavities;

8: negative blood culture, abscesses found in the abdominal cavity alone;

9: negative blood culture, only one small abscess found in the abdominal cavity;

10: negative blood culture, no abscess found in the cavities.

The quantitative variables were described as means and standard deviations. The qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies. The Kruskal-Wallis test was used to evaluate possible differences between the morbidity and mortality scores in the three groups. Dunn's post-hoc test was then used to evaluate possible group-to-group differences. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the weights of the animals in the three groups. The entire statistical analysis was performed using the Graphpad Prism program, version 7. P-values <0.05 were used to reject the null hypothesis.

Results

Prior to the induction of peritonitis, the mean weight of the animals in Groups 0, 1 and 2 was 402.5 ± 24.2 grams, 416.2 ± 37.4 grams and 380.8 ± 48.5 grams, respectively, highlighting the similarity of the groups (Figure 1). The difference between the initial weight and the final weight of the animals in the three groups is shown in Table 1. Weight loss was significantly greater in the non-intervention control group compared to the two intervention groups; however, Groups 1 and 2 did not differ from each other (Figure 2).

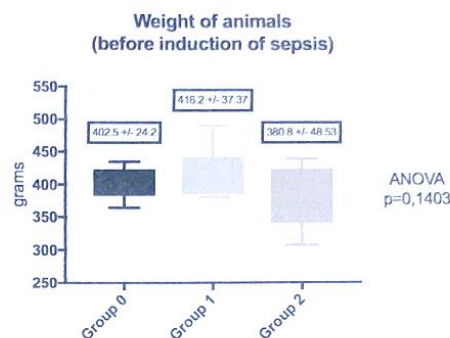


Figure 1 - Weight of the animals prior to the induction of sepsis.

Table 1 - Mean weight of the animals (in grams) at baseline and at the end of follow-up.

Group 0		Group 1		Group 2	
Baseline	Final	Baseline	Final	Baseline	Final
Day 0	Day 15	Day 0	Day 15	Day 0	Day 15
402.5	368.9	416.2	408.4	380.8	385.3

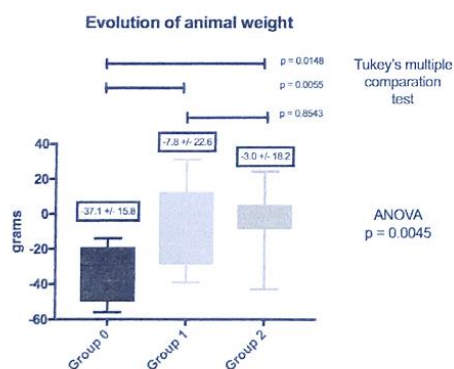


Figure 2 - Weight loss during the study follow-up.

Before the 15-day follow-up was complete, 3 deaths occurred in the control group (Group 0), none in the meropenem group (Group 1) and 1 in the moxifloxacin group (Group 2).

The findings in the cavities varied considerably, with results showing diffuse peritonitis, or single and multiple, intact or ruptured internal abscesses located both in the

abdomen and in other organs such as the liver, kidneys and lungs (Figure 3).

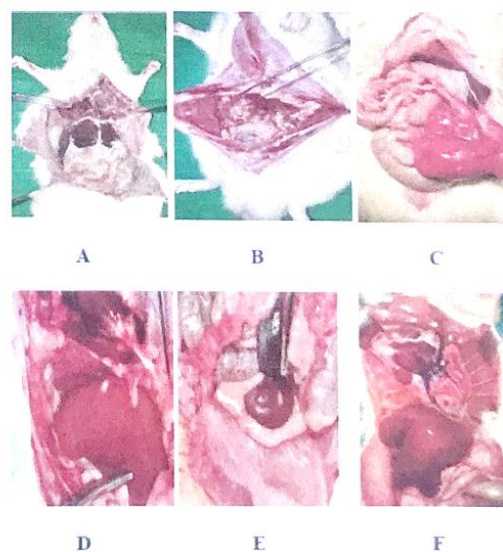


Figure 3 - Diffuse peritonitis and abscesses located at different sites. A. Diffuse peritonitis; B. Multiple abscesses; C. Internal abscesses; D. Liver abscesses; E. Kidney abscesses; F. Lung abscesses.

Blood culture was positive for all the animals in the control group. Of those submitted to meropenem treatment (Group 1),

blood culture was positive in only two, while in Group 2 blood culture was positive in four animals (Table 2).

Table 2 - Blood culture from a sample obtained at the end of follow-up, according to group.

Group 0 (Control Group)			
		Isolated bacteria	
	Blood culture result	1	2
Rat 1	Positive	<i>Escherichia coli</i>	
Rat 2	Positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Rat 3	Positive	<i>Escherichia coli</i>	
Rat 4	Positive	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Rat 5	Positive	<i>Escherichia coli</i>	
Rat 6	Positive	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Rat 7	Positive	<i>Escherichia coli</i>	
Rat 8	Positive	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Rat 9	Positive	<i>Escherichia coli</i>	
Rat 10	Positive	<i>Escherichia coli</i>	
Group 1 (Meropenem)			
	Blood culture result	1	2
Rat 1	Negative		
Rat 2	Positive	<i>Streptococcus viridans</i>	
Rat 3	Negative		
Rat 4	Negative		
Rat 5	Negative		
Rat 6	Negative		
Rat 7	Negative		
Rat 8	Negative		
Rat 9	Positive	<i>Escherichia coli</i>	
Rat 10	Negative		
Group 2 (Moxifloxacin)			
	Blood culture result	1	2
Rat 1	Positive	<i>Streptococcus viridans</i>	
Rat 2	Negative		
Rat 3	Negative		
Rat 4	Negative		
Rat 5	Negative		
Rat 6	Negative		
Rat 7	Negative		
Rat 8	Positive	<i>Escherichia coli</i>	
Rat 9	Positive	<i>Escherichia coli</i>	
Rat 10	Positive	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

In Table 3 one can observe the morbidity and mortality scores for each group at the end of follow-up. Analysis of the morbidity and mortality scores, performed using the Kruskal-Wallis test, showed differences between the groups ($p=0.003$). Following application of

Dunn's multiple comparison test, the difference between the non-intervention control group and the intervention groups was found to be significant. There was no difference between the scores obtained for Group 1 (meropenem) and Group 2 (moxifloxacin) ($p=0.6967$) (Figure 4).

Table 3 - Morbidity/Mortality scores in the three study groups.

Group 0 Non-intervention controls		Group 1 Meropenem		Group 2 Moxifloxacin	
#	Score	#	Score	#	Score
Rat 1	4	Rat 1	10	Rat 1	4
Rat 2	6	Rat 2	6	Rat 2	10
Rat 3	4	Rat 3	10	Rat 3	10
Rat 4*	2	Rat 4	10	Rat 4	8
Rat 5	4	Rat 5	7	Rat 5	10
Rat 6	4	Rat 6	10	Rat 6	8
Rat 7	4	Rat 7	8	Rat 7*	2
Rat 8*	2	Rat 8	10	Rat 8	6
Rat 9	4	Rat 9	6	Rat 9	6
Rat 10*	2	Rat 10	8	Rat 10	6

* Animal died before the end of the 15-day follow-up period.

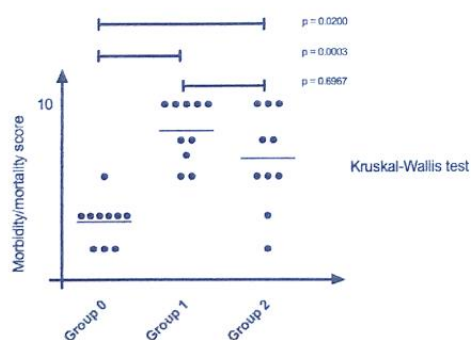


Figure 4 - Morbidity/mortality scores as compared between groups.

■ Discussion

This study provides a pioneering comparative analysis of two treatment

strategies for severe sepsis in a population of aging rats. Sepsis was confirmed by positive blood culture in all the animals that were not submitted to any antibiotic intervention, with mortality rate as high as 30% in that group. Both interventions proved superior to the non-intervention control group, with no difference between the two treatment regimens according to a scoring system previously used in other studies^{24,25}. The antibacterial effectiveness of both meropenem and moxifloxacin was confirmed, and there was a reduction in the extent and severity of the infection with both drugs.

There are some limitations associated with this study that need to be mentioned. Although the weight of the animals in the different groups was similar at baseline, their allocation to the groups was not randomized. Additionally, the clinical signs of sepsis could

have been better monitored if heart rate, respiratory rate and blood pressure had been measured, indicating a failure to adequately evaluate the severity of sepsis. New monitoring devices such as those used in intensive care could have been useful for monitoring the animals²⁶. The fact that all the animals were of the same sex also merits reflection, since men and women respond differently to infection²⁷. Finally, neglecting to administer resuscitation fluids, which is routine conduct in clinical practice, distances this experiment from the usual management of patients with sepsis.

Despite the fact that the majority of cases of sepsis in humans occur in the elderly, reports on experimental models have frequently omitted the animals age or the models used have involved young animals with no comorbidities, rendering it inappropriate to extrapolate the results found in those studies to the real world.

Although the use of experimental sepsis models plays an important role in understanding the condition, dozens of therapeutic interventions such as corticoids, anti-cytokine antibodies and antithrombin III that proved successful in experimental research failed in clinical trials¹⁶. Therefore, there appears to be clear dissociation between basic and clinical research. Nevertheless, the inability to translate knowledge acquired in experimental research to clinical trials should not preclude basic research. On the contrary, this should serve as a challenge to research groups to create models that more closely mimic human responses to infectious conditions. In this respect, the development of the so-called "humanized rodents," in which hematopoietic stem cells are transplanted to the rodents allowing them to acquire a functional immune system similar to that of humans, appears to represent a promising model²⁸. Up to the present time, however, the data obtained remain limited.

■ Conclusions

Sepsis remains an extremely serious condition, particularly in the elderly. Meropenem and moxifloxacin proved to be effective strategies for the treatment of abdominal sepsis in aging rats.

■ References

1. Ludy MJ, Moore GE, Mattes RD. The effects of capsaicin and capsiate on energy balance: critical review and meta-analyses of studies in humans. *Chem Senses*. 2012;37:103-21. doi: 10.1093/chemse/bjr100.
2. Wai K, Yazawa A, Watanabe T. Roles as metabolic regulators of the non-nutrients, capsaicin and capsiate, supplemented to diets. *Proc Jpn Acad*. 2003;79:207-12. doi: 10.2183/pjab.79B.207.
3. Kobata K, Sutoh K, Todo T, Yazawa S, Iwai K, Watanabe T. Nordihydrocapsiate, a new capsinoid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annuum*. *J Nat Prod*. 1999;62(2):335-6. doi: 10.1021/np9803373.
4. Luo XJ, Peng J, Li YJ. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *Eur J Pharmacol*. 2011;650(1):1-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.074.
5. Kobata K, Toda T, Yazawa S, Iwai K, Watanabe T. Novel capsaicinoid like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem*. 1998;46:1695-7. doi: 10.1021/jf980135c.
6. Ohnuki K, Niwa S, Maeda S, Inoue N, Yazawa S, Fushiki T. CH-19 sweet, a non-pungent cultivar of red pepper, increased body temperature and oxygen consumption in humans. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001;65(9):2033-6.
7. Macho A, Lucena C, Sancho R, Daddario N, Minassi A, Muñoz E, Appendino G. Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential. *Eur J Nutr*. 2003;42(1):2-9. doi: 10.1007/s00394-003-0394-6.
8. Lee EJ, Jeon MS, Kim BD, Kim JH, Kwon YG, Lee H, Lee YS, Yang JH, Kim TY. Capsiate inhibits ultraviolet B-induced skin inflammation by inhibiting Src family kinases and epidermal growth factor receptor signaling. *Free*

- Radic Biol Med. 2010;48(9):1133-43. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.034.
9. Pyun BJ, Choi S, Lee Y, Kim TW, Min JK, Kim Y, Kim BD, Kim JH, Kim TY, Kim YM, Kwon YG. Capsiate, a nonpungent capsaicin-like compound, inhibits angiogenesis and vascular permeability via a direct inhibition of Src kinase activity. *Cancer Res.* 2008;68(1):227-35. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2799.
 10. Haramizu S, Kawabata F, Ohnuki K, Inoue N, Watanabe T, Yazawa S, Fushiki T. Capsiate, a non-pungent capsaicin analog, reduces body fat without weight rebound like swimming exercise in mice. *Biomed Res.* 2011;32(4):279-84. doi: 10.2220/biomedres.32.279.
 11. Kwon DY, Kim YS, Ryu SY, Cha MR, Yon GH, Yang HJ, Kim MJ, Kang S, Park S. Capsiate improves glucose metabolism by improving insulin sensitivity better than capsaicin in diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 2013;24(6):1078-85. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.08.006.
 12. Li NS, Luo XJ, Dai Z, Liu B, Zhang YS, Yang ZC, Peng J. Beneficial effects of capsiate on ethanol-induced mucosal injury in rats are related to stimulation of calcitonin gene-related peptide release. *Planta Med.* 2012;78(1):24-30. doi: 10.1055/s-0031-1280217.
 13. Forte GC, Schneider AP. Modulação do gasto energético pela ingestão de capsaicina, cafeína e catequinas: uma revisão sistemática. *RBONE.* 2012;6(35):207-15.
 14. Barros PP, Silva GH, Gonçalves GMS, Oliveira JC, Pagnan LG, Arco-e-Flexa L. Hepatoprotective effect of quercetin pretreatment against paracetamol-induced liver damage and partial hepatectomy in rats. *Braz Arch Biol Technol.* 2017;60(e16160138):1-10. doi: 10.1590/1678-4324-2016160138.
 15. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931;12:186-202. doi: 10.2353/ajpath.2010.090675.
 16. Fiszer-Szafarz B, Nadal C. Lysosomal enzyme activities in the regenerating rat liver. *Cancer Res.* 1977;37(2):354-7. PMID: 832261.
 17. Bitencourt S, Basso B, Mesquita FC, Oliveira JR. Capsaicin modulates proliferation, migration, and activation of hepatic stellate cells. *Cell Biochem Biophys.* 2013;1:1-6. doi: 10.1007/s12013-013-9719-0.
 18. Macho A, Sancho R, Minassi A, Appendino G, Lawen A, Munoz E. Involvement of reactive oxygen species in capsaicinoid-induced apoptosis in transformed cells. *Free Radic Res.* 2003;37:611-9. doi: 10.1080/1071576031000083215.
 19. Pierce AA, Duwaerts CC, Siao K, Mattis AN, Goodsell A, Baron JL, Maher JJ. CD18 deficiency improves liver injury in the MCD model of steatohepatitis. *Plos One.* 2017;12(9):1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0183912.
 20. Takanohashi T, Isaka M, Ubukata K, Mihara R, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids, XIII: inhibitory effects of capsaicin and capsinoids on cytochrome P450 3A4 in human liver microsomes. *Int J Toxicol.* 2008;27(3):119-36. doi: 10.1177/1091581809360282.
 21. Kodama T, Watanabe E, Masuyama T, Tsubuku S, Otabe A, Mochizuki M, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids: II. A 26-week daily gavage dosing toxicity study of CH-19 Sweet extract in rats. *Int J Toxicol.* 2008;27(Suppl 3):11-27. doi: 10.1080/10915810802513379.

Correspondence:

Carlos Teixeira Brandt
Avenida Senador Argemiro de Figueiredo, 1901
58411-020 Campina Grande – PB Brasil
Tel.: (55 83)98105-5920
carlosbrandt@bol.com.br

Received: Jan 18, 2018

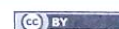
Review: Mar 20, 2018

Accepted: Apr 23, 2018

Conflict of interest: none

Financial source: none

¹Research performed at Experimental Research Unit, UNIFACISA, Medical Sciences, Faculty of Campina Grande (FCM), Brazil. Part of PhD degree thesis, Postgraduate Program in Surgery, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Tutor: Prof. Carlos Teixeira Brandt.



ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA)







Comitê de Ética em Uso de Animais

PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO: 6520042016
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 20/04/2016

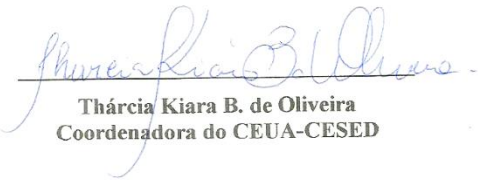
1. Pesquisador Responsável: **Guilherme Veras Mascena**

Título do Projeto: PERITONITE FECAL EM RATOS IDOSOS:
RESPOSTA TERAPÊUTICA A DIFERENTES ESTRATÉGIAS ANTIBIÓTICAS

Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em __20__ / __04__ / __2016__.

Vigência do Projeto	01 de janeiro de 2016 a 01 de março de 2017
Espécie / linhagem	Ratos Wistar
Nº de animais	90
Peso / idade	18 meses
Sexo	Indeterminado
Origem	Biotério FCM

Parecer Final: APROVADO



Thárcia Kiara B. de Oliveira
 Coordenadora do CEUA-CESED