

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

GUSTAVO COSTA PINTO

**Efeitos da Sepsis Sobre o Envelhecimento Vascular**

VITÓRIA

2021

GUSTAVO COSTA PINTO

**Efeitos da Sepsis Sobre o Envelhecimento Vascular**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de concentração de Fisiologia Cardiovascular.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Frizera Vassallo.

VITÓRIA

2021

**Pinto, Gustavo Costa, 1992**

**Efeitos da Sepsis sobre o Envelhecimento Vascular.** [Vitória] 2021.

121 p (UFES, Ciências Fisiológicas, 2021)

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde .

1.Sepsis; 2. Envelhecimento; 3. Óxido nítrico; 4. Ciclooxigenase; 5. Reatividade vascular; 6.Disfunção vascular.

Dedico esta tese de doutorado, com muito carinho e gratidão, à minha mãe e familiares que amo profundamente. Obrigado pelo suporte incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pelas sábias escolhas dos melhores caminhos e por tornar tudo isso possível.

A minha mãe, por todas as abdições em função de minhas necessidades. Mãe, obrigado pela confiança, por acreditar e vibrar a cada sonho meu realizado. Ao meu pai, mesmo distante, pelo incentivo. Aos meus avós Penha e Antônio, por me mostrar o real sentido da família, com suporte emocional e financeiro quando precisei. À minha tia Cláudia e minha querida prima Carolina, pelo amor incondicional e por me apoiarem durante toda trajetória. Aos familiares maternos, Osvaldina, Andreia, Miriã, Francinei, Suely, Rogério, Flávia, Marlinda e Marta, que por vários momentos me trouxeram conforto e inspiração para continuar lutando.

À Profa. Dra. Paula, pela confiança desde o começo de minha caminhada na pesquisa e por aceitar o desafio de um doutorado direto, obrigado por fazer parte da concretização de mais uma etapa e pela parceria constante.

Aos professores e parceiros de laboratório, Valério, Dalton e Ivanita. Professores, obrigado pelas ideias, questionamentos que me fizeram amadurecer e por dar sentido a muitos dos conhecimentos que pareciam abstratos para mim. Agradeço por compartilharem a vasta sabedoria em prol da ciência.

Agradeço a todos aos meus amigos pelo companheirismo e pela força, em especial aos meus amigos do LEMC que tornaram o ambiente de trabalho um lugar mais leve e alegre.

Agradeço a Monalessa, pelo importante suporte ao desenvolvimento do nosso modelo experimental de estudo. Ao prof. Daniel por ceder seu biotério para desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas de outros laboratórios, que juntos compartilhamos muitos momentos durante as disciplinas, eventos e confraternizações.

À banca examinadora, obrigado de antemão, pelas correções, contribuições e disponibilidade.

À todos os professores do PPGCF/UFES, pela contribuição em minha formação.

À todos os funcionários do PPGCF/ UFES, pelos serviços prestados.

À CAPES, CNPq e FAPES pelo apoio financeiro.

"Sábio é aquele que conhece os limites da  
própria ignorância."

Sócrates

## RESUMO

A sepse é definida como disfunção orgânica, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção, que acomete milhões de pessoas anualmente e o envelhecimento atua como importante fator de risco para pior prognóstico e desfecho clínico. Com isso, o objetivo do nosso estudo foi avaliar os efeitos da sepse sobre a reatividade vascular no contexto do envelhecimento em um modelo experimental de sepse estafilocócica, após 24 horas de sua indução, em camundongos da espécie Balb-c. Animais de 3 e 12 meses (3M e 12 M respectivamente) foram submetidos à inoculação intraperitoneal de uma preparação de 150 µL com *Staphylococcus Aureus* sensível à meticilina ( $1,8 \times 10^9$  UFC/mL) para os grupos sepse (SP) ou tampão fosfato-salino (PBS) para os grupos controle (CT). A sepse aumentou a letalidade em ambos os grupos, sendo significativamente maior no de 12M, e aumentou os níveis plasmáticos de DNA livre circulante de forma similar. Foi observado redução no relaxamento vascular em curvas acetilcolina-dependentes nos grupos de ambas as idades, contudo, animais de 12 M submetidos a sepse apresentaram redução da reatividade vascular durante as curvas fenilefrina-dependentes, que não foi observado em animais sépticos com 3M. A incubação com L-NAME, inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), reverteu a hiporresponsividade das curvas fenilefrina-dependentes de animais com 12 M, o mesmo foi observado durante a incubação com de aminoguanidina, inibidor da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), sugerindo, a participação do óxido nítrico (NO) derivado da iNOS, no aumento do efeito anti-contrátil durante a sepse. A incubação com indometacina, inibidor da ciclooxigenase (COX), também reverteu a hiporresponsividade em curvas fenilefrina-dependentes, fortalecendo a hipótese da presença de prostanoídes vasodilatadores na redução da reatividade vascular à fenilefrina em animais de 12 M. Além disso, a incubação com tempol, mimético da superóxido dismutase (SOD) e losartan, antagonista de receptores de angiotensina 1 (AT1), reduziram ainda mais as respostas vasoconstritoras observadas durante as curvas fenilefrina-dependentes em animais de 12 M, sugerindo a presença de espécies reativas de oxigênio (EROS) e atividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) em nosso modelo de estudo. Em conclusão, observamos que, a sepse estafilocócica, promove hiporresponsividade vascular à agentes vasoconstritores exclusivamente em animais envelhecidos por mecanismos que

envolve a produção de NO derivado da iNOS e prostanóides vasodilatadores da via COX . Esses achados, acrescidos da presença de produtos das EROS e do SRAA, podem contribuir para falência vascular e pior desfecho clínico observado.

**Palavras chaves:** sepse, envelhecimento, óxido nítrico, ciclooxigenase, reatividade vascular, disfunção vascular.

## ABSTRACT

Sepsis is defined as organic dysfunction, caused by an unregulated host response to infection, which affects millions of people annually, and aging acts as an important risk factor for a worse prognosis and clinical outcome. Thus, the aim of our study was to evaluate the effects of sepsis on vascular reactivity in the context of aging in an experimental model of staphylococcal sepsis, 24 hours after its induction, in mice of the species Balb-c. Animals aged 3 and 12 months (3M and 12M respectively) were subjected to intraperitoneum inoculation of a 150  $\mu$ L preparation with methicillin-sensitive *Staphylococcus Aureus* ( $1.8 \times 10^9$  CFU/mL) for sepsis groups (SP) or phosphate buffer -saline (PBS) for the control groups (CT). Sepsis increased lethality in both groups, being significantly higher in the 12M group, and increased plasma levels of circulating free DNA in a similar way. A reduction in vascular relaxation was observed in acetylcholine-dependent curves in both age groups, however, 12 M animals submitted to sepsis showed a reduction in vascular reactivity during phenylephrine-dependent curves, which was not observed in septic animals with 3M. Incubation with L-NAME, an inhibitor of the nitric oxide synthase (NOS) enzyme, reversed the hyporesponsiveness of the phenylephrine-dependent curves of animals with 12 M, the same was observed during the incubation with aminoguanidine, an inhibitor of the induced nitric oxide synthase enzyme (iNOS), suggesting the participation of iNOS-derived nitric oxide (NO) in the increase of the anti-contractile effect during sepsis. Incubation with indomethacin, a cyclooxygenase (COX) inhibitor, also reversed hyporesponsiveness in phenylephrine-dependent curves, strengthening the hypothesis of the presence of vasodilator prostanoids in reducing vascular reactivity to phenylephrine in 12 M animals. Furthermore, incubation with tempol, a superoxide dismutase (SOD) mimetic and losartan, an angiotensin 1 (AT1) receptor antagonist, further reduced the vasoconstrictor responses observed during the phenylephrine-dependent curves in 12 M animals, suggesting the presence of reactive oxygen species (ROS) and activity of the renin angiotensin aldosterone system (SRAA) in our study model. In conclusion, we observed that staphylococcal sepsis promotes vascular hyporesponsiveness to vasoconstrictor agents exclusively in aged animals by mechanisms that involve the production of iNOS-derived NO and vasodilator prostanoids from the COX pathway. These findings, added to the presence of ROS and RAAS products, may contribute to vascular failure and worse

clinical outcome observed.

**Key words:** sepsis, aging, nitric oxide, cyclooxygenase, vascular reactivity, vascular dysfunction.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Alterações associadas ao envelhecimento arterial na composição e estrutura das camadas vasculares. A figura acima representa as principais modificações do envelhecimento na artéria aorta em comparação com um indivíduo jovem. Na camada íntima, destacamos o espessamento desta camada, a hiperplasia e disfunção endotelial e a deposição de colágeno; a camada média apresenta degradação de elastina, maior deposição de colágeno e maior proliferação de células musculares lisas; e na camada adventícia observa-se maior deposição de colágeno (Elaborado pelo autor). .....28

**Figura 2:** Representação ilustrativa da síntese e liberação de NO (Elaborada pelo autor).....30

**Figura 3:** Possíveis mecanismos envolvidos na disfunção endotelial induzida pelo envelhecimento. Em azul, reduzido no envelhecimento: produção de óxido nítrico (NO), L-arginina e substratos da eNOS, cofatores da eNOS: tetrahydrobiopterina (BH4), expressão e/ou atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), quinases que fosforilam a eNOS. Em vermelho, aumentado no envelhecimento: atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), degradação da L-arginina por arginases, produção de tromboxano (TXA2), produção de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Elaborada pelo autor).....32

**Figura 4:** Mecanismos de disfunção endotelial na sepse. Destruição do glicocálice; exposição de mecanotransdutores; produção de EROS via NADPH oxidase; aumento de NO via iNOS ; redução de enzimas antioxidantes; presença de micropartículas (Elaborada pelo autor).....35

**Figura 5:** Esquema de grupos experimentais. Para a realização deste estudo, os camundongos da raça Balb C, foram divididos em 4 grupos experimentais. Animais do grupo Controle (CT) com 3 meses (3M) e 12 meses (12M) de idade e animais do

grupo Sepses com 3 meses (3M) e 12 meses (12M) de idade (Elaborado pelo autor)..40

**Figura 6:** Modelo de sepsis por inoculação estafilocócica. Amostras de *Staphylococcus Aureus* (*S. Aureus*) foram preparadas e inoculadas na cavidade intraperitoneal de animais do grupo Sepses com 3 meses (3M) e 12 meses (12M) de idade. Para animais do grupo Controle (CT) com 3 meses (3M) e 12 meses (12M) de idade, foi administrado solução tampão fosfato-salino (PBS) (Elaborado pelo autor).42

**Figura 7:** Análise plasmática das concentrações de DNA livre circulante de células (cfDNA). Após 24 horas de indução da sepsis moderada, os animais dos grupos Sepses (SP) e Controle (CT) com 3 meses (3M) e 12 meses (12M) de idade, foram anestesiados e exsanguinados. Amostras do plasma foram colhidas para análise da concentração plasmática de cfDNA e a artéria aorta foi preparada para técnica de reatividade vascular (Elaborado pelo autor).....44

**Figura 8:** Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de artéria aorta para realização de estudos de reatividade vascular *in vitro*.....46

**Figura 9:** Registro com curvas do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e da avaliação da integridade funcional do endotélio. (KCl: cloreto de potássio; ACh: acetilcolina). .....47

**Figura 10:** Esquema representativo dos protocolos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe) e acetilcolina (ACh) após estabilização de 30 minutos (Adaptado de Batista,2014).....48

**Figura 11:** Figura 11. Avaliação da sobrevivência de animais sépticos com 3 e 12 meses. O número de animais sobreviventes foi avaliado a cada 8 horas. Os resultados foram expressos por sobrevivência cumulativa e analisados pelo teste de Kaplan-Meier. (3 meses, n=20; 12 meses, n=15). \*p> 0.05 vs 3 meses.....50

**Figura 12:** Nível plásmatico de DNA livre circulante (cfDNA – ng/ul): (A) Camundongos do grupo controle (CT 3M) (n=8) e sepse (SP 3M) (n=8) com 3 meses. (B) Camundongos do grupo controle (CT 12M) e sepse (SP 12M) com 12 meses. Para análise comparativa foi utilizado o Teste-t não pareado. \* P < 0,05, CT vs SP.....50

**Figura 13:** Resposta dilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artéria aorta de camundongos controle (CT) e sepse (SP) com 3 meses (3M) (A) e 12 meses (12M) (B). Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à FE. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e da sensibilidade (pD<sub>2</sub>) foi utilizado o Teste t não pareado: \*P < 0,05, CT vs SP. .... 52

**Figura 14:** Resposta contrátil induzida por fenilefrina, em segmentos de artéria aorta torácica de camundongos dos grupos controle (CT) e sepse (SP) com 3 meses (3M) (A) e 12 meses (12M) (B). Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contracção induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contracção induzida por 120mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e da sensibilidade (pD<sub>2</sub>) foi utilizado o Teste t não pareado: \*P < 0,05, CT vs SP. .... 53

**Figura 15:** Efeito do L-NAME (100 µM), inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta de camundongos dos grupos controle (CT) (A) e submetidos a sepse (SP) (B). Em C, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em aorta, de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contracção induzida 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima (R<sub>máx</sub>), sensibilidade (pD<sub>2</sub>) e dAUC foi utilizado o Teste-t não pareado. \*P<0,05 CT/ SP vs LNAME. # P<0,05 CT vs SP... .... 55

**Figura 16:** Efeito do inibidor da iNOS, Aminoguanidina, sobre a resposta contrátil

induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artéria aorta de camundongos dos grupos controle (CT) (A) e submetidos a sepse (SP) (B) em aorta de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) foi utilizado o Teste-t não pareado. \*P<0,05 CT/SP vs Aminguanidina. &P<0,05 CT vs SP.....56

**Figura 17:** Efeitos da indometacina (10 µM), inibidor da ciclooxigenase, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de aorta de camundongos dos grupos controle (CT) (A) e submetidos a sepse (SP) (B). Em C, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em aorta de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) foi utilizado o Teste-t não pareado. \* P<0,05 CT/SP vs Indometacina. # P<0,05 CT vs SP... ..57

**Figura 18:** Efeitos do Tempol (10 µM), mimético da superóxido dismutase, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de aorta de camundongos dos grupos controle (CT) (A) e submetidos a sepse (SP) (B). Em C, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em aorta de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) foi utilizado o Teste-t não pareado. \* P<0,05 CT/SP vs Tempol. # P<0,05 CT vs SP.....59

**Figura 19:** Efeitos do Losartan (10 µM), bloqueador de receptores AT<sub>1</sub>, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de aorta de camundongos dos grupos controle (CT) (A) e submetidos a sepse (SP) (B). Os

resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) foi utilizado o Teste-t não pareado. \* P<0,05 CT/SP vs Losartan.....60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação da sepse. (Elaborada pelo autor).....	33
<b>Tabela 2:</b> Escore clínico para estratificar a sepse em modelo animal. ....	43
<b>Tabela 3:</b> Níveis plasmáticos de cfDNA – ng/ul obtidos do plasma de camundongos dos grupos Controle e Sepse 3 meses (3M) e 12 meses (12M). ....	51
<b>Tabela 4:</b> Valores de pD2 e R <sub>máx</sub> obtidos das curvas concentração-resposta à a acetilcolina e fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 3 meses (3M).. ....	53
<b>Tabela 5:</b> Valores de pD2 e R <sub>máx</sub> obtidos das curvas concentração-resposta à a acetilcolina e fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M). ....	53
<b>Tabela 6:</b> Valores de pD2 e R <sub>máx</sub> obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M) pré-incubadas com L-NAME. ....	54
<b>Tabela 7:</b> Valores de pD2 e R <sub>máx</sub> obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M) pré-incubadas com aminoguanidina.....	56
<b>Tabela 8:</b> Valores de pD2 e R <sub>máx</sub> obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M) pré-incubados com indometacina.....	57
<b>Tabela 9:</b> Valores de pD2 e R <sub>máx</sub> obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12	

meses (12M) pré-incubados com tempol.....58

**Tabela 10:** Valores de  $pD_2$  e  $R_{m\acute{a}x}$  obtidos das curvas concentrao-resposta à fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M) pré-incubados com losartan.....60

## LISTA DE ABREVIACOES

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

AA: cido araquidnico

AC: Adenilato

ciclase ACh:

Acetilcolina

ADP: Adenosina

difosfato

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

AMPK: Proteína quinase dependente de AMPc

ANG II: Angiotensina 2

ANOVA: Análise de variância

AT1: Angiotensinrgicos 1

ATP: Adenosina trifosfato

BH4: Tetrahidrobiopterina

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA: Comitê de tica em experimentação

cfDNA: DNA livre circulante

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico

COX: Ciclooxygenase

COX-1: Ciclooxygenase-1

COX-2: Ciclooxygenase-2

CT: Grupo Controle

CXCL1: Quimiocina ligante 1

CXCL2: Quimiocina ligante 2

dAUC: Diferenças das áreas abaixo das curvas

DO: Densidade óptica

DCV: Doenças cardiovasculares

ECA: Enzima conversora de angiotensina

eNOS: Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio ET: Endotelina

FAD: Flavina-adenina-dinucleotídeo

FAPES: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo

Fe: Fenilefrina

FMN: Flavinmononucleotídeo

GMPc: 3,5 – monofosfato cíclico de guanosina

H<sub>2</sub>O: Água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$

IL-6: Interleucina 6

iNOS: Isoforma induzível da sintase de óxido nítrico

KCl: Cloreto de potássio

Kg: quilograma

L-NAME: N G -nitro-L-arginina metil éster

LPS: Lipopolissacarídeo

M: Molar

M: meses

mg: Miligrama

µm: Micrômetro

Mm: Micromolar

MSSA : Staphylococcus Aureus sensível à metilina

mL: Mililitro

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato

NETs: Armadilhas extracelulares de neutrófilos

nNOS - Isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Ânion superóxido

OH<sup>-</sup>: Radical hidroxila

ONOO<sup>-</sup>: Peróxido de nitrito

PBS: Tampão fosfato-salino

PD<sub>2</sub>: prostaglandina D<sub>2</sub>

pD<sub>2</sub>: Sensibilidade

PGF<sub>2α</sub>: Prostaglandina F<sub>2α</sub>

PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina

PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>

PLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A<sub>2</sub>

PRRs: Receptores de reconhecimento padrão

R<sub>máx</sub>: Resposta máxima

RPM: Rotações por minuto

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório

SOD: Superóxido dismutase

SP: Sepsis

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TBS: Caldo de soja triptona

TLRs: Toll-like receptors

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alfa

TXA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>

UTIs: Unidades de Terapia Intensiva

UFC: Unidades formadoras de colônias

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

$\mu$ M: Micromolar

nm: Nanometro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
1.1 ENVELHECIMENTO VASCULAR .....	28
1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE .....	33
1.3 SEPSE E O ENVELHECIMENTO .....	37
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
3.1. GRUPOS DE ESTUDO .....	40
3.2 MODELO DE SEPSE EXPERIMENTAL.....	41
<b>3.2.1 Escore clínico da sepse</b> .....	<b>43</b>
3.3 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA .....	43
3.4 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE DNA LIVRE CIRCULANTE .....	44
3.5 REATIVIDADE VASCULAR.....	45
<b>3.5.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio</b> .....	<b>46</b>
<b>3.5.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio</b> .....	<b>46</b>
<b>3.5.3 Efeitos da sepse na resposta contrátil a fenilefrina e vasodilatadora à acetilcolina em artérias aorta</b> .....	<b>47</b>
<b>3.5.4 Participação do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio, dos prostanóides e do sistema renina angiotensina aldosterona na resposta contrátil a fenilefrina e vasodilatadora à acetilcolina em artérias aorta</b> ....	<b>48</b>
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
4.1 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA .....	50

4.2 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE DNA LIVRE CIRCULANTE (cfDNA) EM ANIMAIS DE 3 E 12 MESES APÓS 24 HORAS DE INDUÇÃO DA SEPSE .....	50
4.3 EXPERIMENTOS DE REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA .....	51
4.3.1 Efeito da sepse moderada sobre a reatividade à acetilcolina em anéis isolados de aorta em camundongos de 3 meses e 12 meses.....	51
4.3.2 Efeito da sepse moderada sobre a reatividade à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos com 3 meses e 12 meses .....	52
4.3.3 Efeito da sepse moderada sobre a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos com 12 meses .....	54
4.3.4 Efeitos da sepse moderada sobre a participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos com 12 meses ..	56
4.3.5 Efeitos da sepse moderada sobre a participação de espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos com 12 meses .....	58
4.3.6 Efeitos da sepse moderada sobre a participação do sistema renina angiotensina aldosterona na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos com 12 meses .....	59
5 DISCUSSÃO .....	61
6 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS.....	68
7 CONCLUSÕES .....	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
9 SUBPROJETOS .....	90
10 ANEXO I.....	91
10.1. O POTENCIAL DA ESPECTROSCOPIA FT-IR PARA MELHORAR OS CUIDADOS DE SAÚDE NA SEPSE .....	91
10.2 REFERÊNCIAS .....	93

<b>11 ANEXO II</b> .....	<b>95</b>
11.1 BIOMARCADORES DA SEPSE: DNA LIVRE CIRCULANTE.....	95
11.2 REFERÊNCIAS.....	97
<b>12 ANEXO III</b> .....	<b>98</b>
12.1 ARTIGO PUBLICADO .....	98
<b>13 ANEXO IV</b> .....	<b>107</b>
13.1 TRABALHO ACEITO EM REVISTA CIENTÍFICA.....	107

## 1 . INTRODUÇÃO

A sepse é definida como disfunção orgânica com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (SINGER, 2016). Os fatores de risco para sepse são variáveis, contudo, destacam-se a presença de comorbidades, uso de dispositivos invasivos, sexo e a idade (NASA, 2012). Sepse, choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos são as maiores causas de morte nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) em todo mundo (SEYMOUR et al. 2016). É responsável por aproximadamente 11% de todas as admissões em UTI em países desenvolvidos, muitas vezes em associação com idade avançada, comorbidades e uso de medicamentos imunossupressores (PERNER, 2016). A sepse afeta entre 3 a 10 a cada 1.000 habitantes por ano e acarreta uma mortalidade associada de 18 a 35% em países de terceiro mundo (SINGER, 2016). Apesar de todos os avanços na medicina, a mortalidade no Brasil, ainda é elevada, atingindo valores acima de 50% (ILAS, 2018). A incidência e prevalência de sepse aumentaram globalmente nos últimos anos (GENGA, 2017), em parte devido ao aumento da idade populacional (GOTTS, 2017).

A sepse afeta desproporcionalmente adultos de maior idade, observa-se que mais 60% dos diagnósticos de sepse, são atribuídos a adultos com 65 anos ou mais (TUCSEK et al. 2013). Dados considerados preocupantes frente a tendência demográfica de mudança em direção ao envelhecimento da população no Brasil e no mundo (GOTTS, 2017).

Como consequência, a sepse é a décima maior causa de morte em indivíduos acima dos 65 anos (TUCSEK et al. 2013; MARTIN, 2006). A proporção de eventos sépticos é maior na população idosa (58- 65%), tendo as taxas de incidência e mortalidade significativamente maiores nesse público (NASA, 2012). Indivíduos com idade avançada, correm um risco maior de contrair patógenos infecciosos devido ao declínio do sistema imunológico e das defesas anatômicas e fisiológicas, além de outras alterações relacionadas à idade (GIRARD, 2005). Gotts, 2017, afirma que o avanço da idade é um forte fator de risco para a sepse, explicado pela presença de múltiplas comorbidades pré-existentes.

As modificações vasculares associadas à idade, são fatores que desencadeiam diferentes respostas frente o evento séptico, quando comparados com os adultos

mais jovens, interferindo consideravelmente no desfecho do processo infeccioso (CLIFFORD, 2016). Os vasos sanguíneos podem não responder adequadamente à hipóxia ou hipercarbia, além de apresentarem prejuízo na resposta vasodilatadora dependente do endotélio (SCHWARTZ, 2011). Ademais, durante o envelhecimento, as paredes arteriais se tornam espessas e com menor complacência devido ao aumento dos níveis de colágeno e diminuição da elastina, resultando na alteração da pressão arterial (HEINEMAN, 2010). Achados que contribuem, como descrito por Umberger, 2015, para indivíduos com idade avançada progredirem mais facilmente para sepse na sua forma grave.

A resposta inflamatória mediada pela sepse, resulta em ativação, alterações e danos em células endoteliais vasculares, estabelecendo um modelo de disfunção endotelial, caracterizado por hipotensão e hiporesponsividade aos vasoconstritores (WALBORN, 2019). Colleta, 2014, mostrou que animais idosos apresentavam maior severidade na disfunção endotelial quando associado ao evento séptico, indicando pior desfecho clínico para esse grupo de animais. Como já mencionado, as alterações vasculares fisiopatológicas específicas do envelhecimento aumentam o risco súbito para evolução da sepse grave, fundamentando o aumento da mortalidade em tais pacientes (CLIFFORD, 2016).

Há pouca descrição na literatura quanto aos mecanismos subjacentes às alterações relacionadas à idade em resposta à inflamação sistêmica da sepse, que frente às suas características epidemiológicas, justificam a necessidade de maior compreensão.

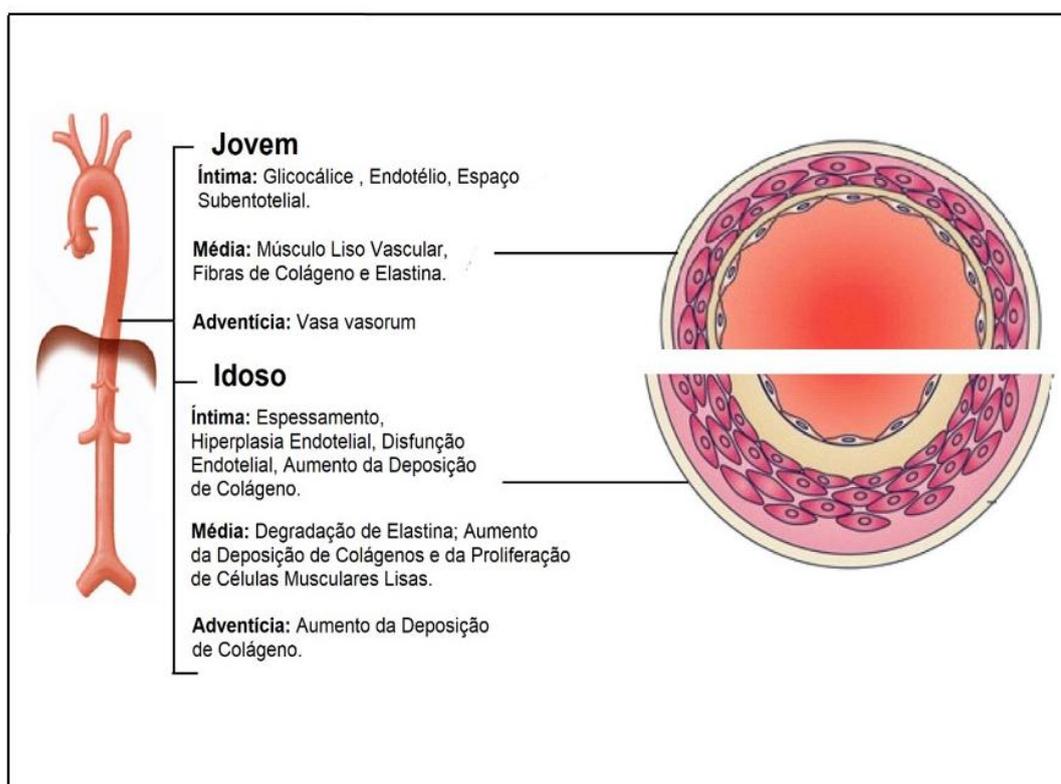
## **2. ENVELHECIMENTO VASCULAR**

O sistema cardiovascular garante o fluxo sanguíneo adequado para o organismo, regulando o transporte e distribuição de compostos essenciais para os tecidos, remoção dos metabólitos, controle da temperatura e pH (MICHELINI e ROSSONI, 2008). Com o avanço da idade, mudanças estruturais e funcionais complexas ocorrem nesse sistema (TESAURO, 2017). Tais modificações, apoiam estudos que demonstram que o risco de sofrer doenças cardiovasculares (DCV) aumenta à medida que envelhecemos (COOPER, 1994; LAKATA, 2003).

Os vasos sanguíneos são compostos por três camadas, também denominadas túnicas: íntima, média e adventícia. As referidas camadas podem variar em

espessura e complexidade estrutural de acordo com a sua função ou localização. Como descrito por Van Den Munckhof, 2012, os vasos sofrem alterações estruturais à medida que envelhecem. O espessamento gradual da parede vascular, mudanças no conteúdo da parede e o aumento do diâmetro do vaso, são observados com a idade avançada. Essas modificações evidenciam grande relação com a rigidez vascular observada em vários estudos associados ao envelhecimento (LAKATTA, 2003; WANG, 2010; VLACHOPOULOS, 2010; VAN DEN MUNCKHOF, 2012; THIJSSSEN, 2016), predizendo assim, maior risco para eventos cardiovasculares futuros.

Modificações mediadas pelo envelhecimento podem ser observadas através da estrutura das artérias elásticas como a aorta e seus principais ramos. Como visto na **Figura 1**, podemos demonstrar uma compilação de mudanças observadas no envelhecimento dessas artérias.



**Figura 1: Alterações associadas ao envelhecimento arterial na composição e estrutura das camadas vasculares.** A figura acima representa as principais modificações do envelhecimento na artéria aorta em comparação com um indivíduo jovem. Na camada íntima, destacamos o espessamento desta camada, a hiperplasia e disfunção endotelial e a deposição de colágeno; a camada média apresenta degradação de elastina, maior deposição de colágeno e maior proliferação de células musculares lisas; e na camada adventícia observa-se maior deposição de colágeno (Elaborada pelo autor).

Uma observação comumente relatada em estudos que descrevem o impacto da idade na estrutura arterial, é o aumento da espessura das camadas íntimas-médias de artérias elásticas, como visto por Homma, 2001 em artérias carótidas, cujo aumento ocorre linearmente com a idade tanto em homens quanto em mulheres. Vale ressaltar que apesar do maior direcionamento em estudos com artérias elásticas de maior calibre, também é observado espessamento da parede arterial com a idade em vasos periféricos de menor calibre tanto de membros superiores quanto inferiores (VAN DEN MUNCKHOF, 2012).

O diâmetro arterial demonstra aumento gradual com a idade. Estudos em vasos de membros inferiores observaram aumento do diâmetro de artérias poplíteas e femorais ao longo de um intervalo de idade (25-67 anos), o equivalente a um aumento de aproximadamente 0,5% por ano (SANDGREN, 1998; 1999). Contudo, pouco se sabe explicar os mecanismos para aumento do diâmetro relacionados à idade. Sugere-se mecanismos compensatórios ao espessamento arterial e a perda de elastina (THIJSSSEN, 2016).

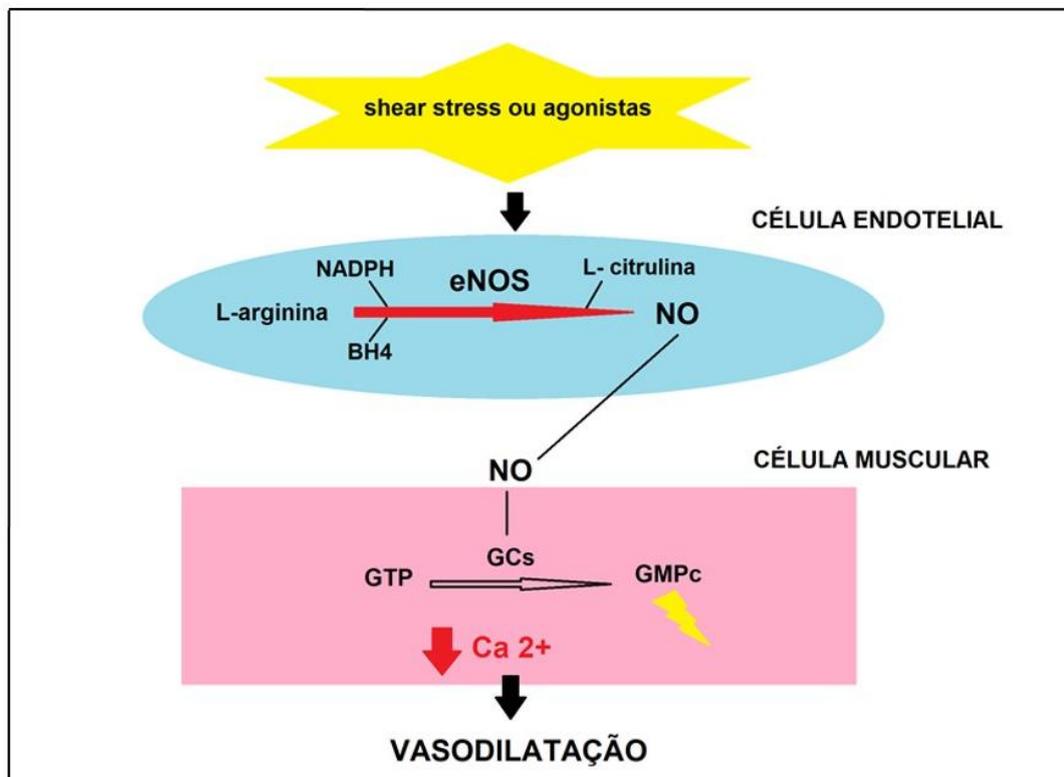
Por fim, a rigidez dos vasos também representa uma das modificações do sistema vascular durante o envelhecimento, caracterizada pela diminuição da complacência das artérias e considerada forte preditor para DCV (VLACHOPOULOS, 2010). A perda ou a desorganização da elastina e sua substituição por colágeno determina o aumento da rigidez da parede. Portanto, o desequilíbrio desse sistema, causado por vários fatores, dentre eles, processos inflamatórios, contribuem para redução da distensibilidade vascular (BLACHER & SAFAR, 2005). Reiterando, mais uma vez a magnitude das alterações vasculares associadas ao espessamento da camada íntima-média, diâmetro e rigidez arterial, em predizer eventos cardiovasculares futuros, como doenças coronarianas, derrames e insuficiência cardíaca (LAKATA, 2003).

O endotélio, presente na túnica íntima, atua fisiologicamente como uma barreira física entre o sangue e os tecidos subjacentes dos vasos sanguíneos, além de fonte para uma variedade de substâncias reguladoras envolvidas com o balanço da vasodilatação e vasoconstrição, considerado crucial, no controle parácrino da estrutura e função vascular (RAJENDRAN, 2013). Além disso, essa monocamada celular desempenha funções que contribuem em manter a homeostase, regulação e modulação de várias funções fisiológicas, como a agregação plaquetária, inflamação, angiogênese, mecanotransdução e fibrinólise (VANE et al. 1990;

RAMOS, 1992).

As células endoteliais sobre o efeito do envelhecimento, desenvolvem desequilíbrio entre os componentes vasodilatadores e vasoconstrictores, fatores pró e antioxidantes, pró e anti-inflamatórios e sinais pró e antitrombóticos, caracterizando uma disfunção endotelial mediada pela idade (RODRIGUEZ-MAÑAS, 2009; GREEN, 2011), condição associada a um dos principais mecanismos pelos quais o envelhecimento aumenta o risco de DCV (RODRIGUEZ-MAÑAS, 2009).

Considerado o principal mediador do relaxamento vascular, o NO é sintetizado, principalmente, através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em uma reação que envolve a conversão do aminoácido L-arginina para L- citrulina e NO (**Figura 2**), na presença de cofatores como o oxigênio, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), FAD (flavina adeninad nucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo) e BH4 (tetrahydrobiopterina) (STUEHRET, 1991; HEVEL et al., 1991; MICHEL & VANHOUTTE, 2010). A NOS é representada por 3 isoformas: a presente em células endoteliais (eNOS), em células neuronais ( nNOS), ditas constitutivas e isoforma induzida (iNOS ) por estímulos imunológicos, podendo ser expressa em macrófagos e células endoteliais (FORSTERMANN et al., 2012).



**Figura 2:** Representação ilustrativa da síntese e liberação de NO (Elaborada pelo autor)

O comprometimento da biodisponibilidade ou aumento da degradação de NO

mediado pela progressão da idade, aparece como determinante para disfunção endotelial, afetando diretamente o relaxamento dependente do endotélio (TESAURO, 2017). Já dizia Mitchell, 2004, que o envelhecimento é o fator independente que mais influencia o relaxamento dependente do endotélio, corroborando que homens e mulheres de idade avançada apresentam disfunção endotelial, mesmo na ausência de doença clínica.

Ainda, vários estudos apontam que a inflamação e o estresse oxidativo, são processos patológicos importantes que impactam na biodisponibilidade de NO e determinam a disfunção endotelial em idosos saudáveis e em modelos de roedores (LEKAWANVIJIT et al. 2012; NEIRYNCK et al. 2013; TESAURO, 2017).

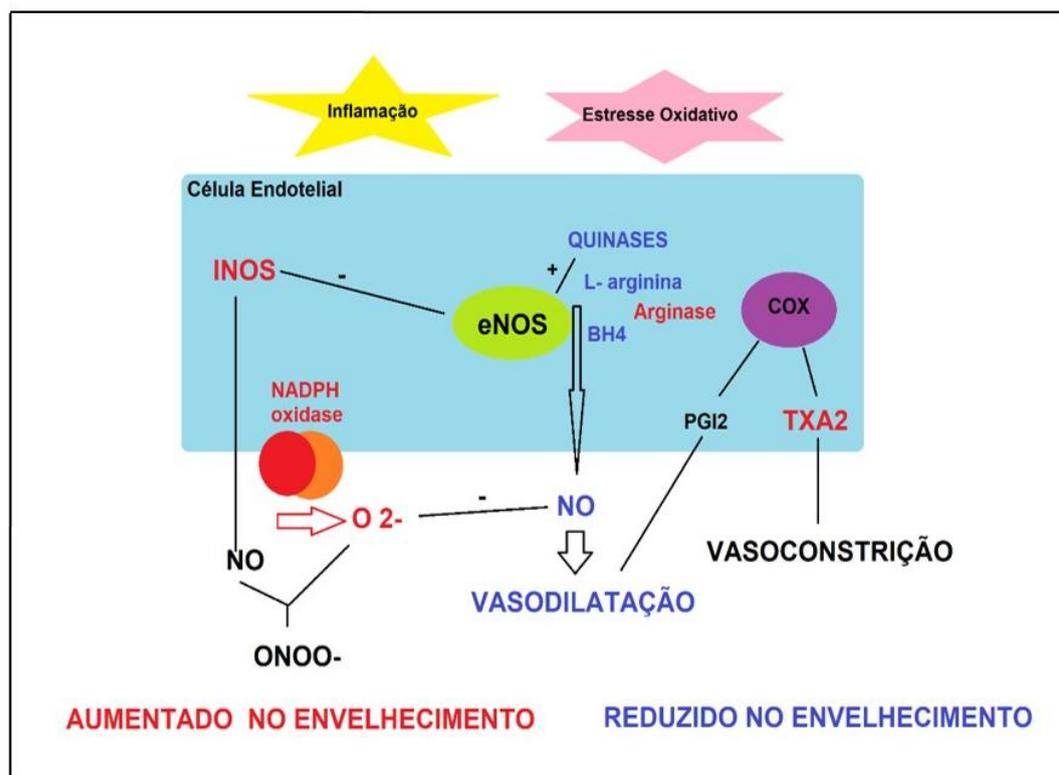
O desbalanço oxidativo é originado a partir do aumento de substâncias denominadas espécies reativas de oxigênio (EROS), frente a incapacidade de enzimas antioxidantes controlarem essa produção, promovendo assim, a liberação de substâncias eletricamente instáveis e potencialmente reativas, capazes de causar oxidação (PARAVICINI, 2008). Segundo Yuyun, 2018, destacam-se como EROS de relevância: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^-$ ), presentes comumente em várias fisiopatologias cardiovasculares, geradoras de estresse oxidativo.

Com importante papel na regulação de EROS, a atividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), tem sido demonstrada durante o envelhecimento, através do aumento de sinalização de receptores de angiotensina (ANG) e da atividade da NADPH oxidase em células endoteliais (VAN THIEL, 2015), contribuindo, ainda mais, com o desequilíbrio oxidativo. Esses achados, corroboram o potencial das vias de sinalização de angiotensina, em induzir o estresse oxidativo e danos endoteliais, fundamentado pela inativação do NO e desbalanço vasomotor, caracterizando assim, um fenótipo de envelhecimento vascular (FERDER, 2002; XU, 2017).

Estudo de Costa, 2016, demonstrou a relação entre o SRAA com o aumento da atividade das ciclooxigenases, em modelo animal de envelhecimento. Dentre os diversos componentes associados a disfunção vasomotora em idade avançada, destacam-se os prostanóides. Derivados do ácido aracônico (AA), são substâncias liberadas pelo endotélio, que desempenham importante função na regulação do tônus vascular em condições fisiológicas e patológicas (WRIGHT et al., 2001). Os prostanóides são sintetizados a partir da ação da fosfolipase A2 (PLA2), seguido por

uma oxidação mediada pela ciclooxigenase (COX), enzima chave na síntese de prostanóides (BOS et al., 2004). Destes, os comuns são prostaciclina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub> (PD<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). O aumento da formação de produtos da COX, também intermedeia a disfunção endotelial relacionada ao envelhecimento, gerando desequilíbrio nos componentes vasodilatadores e vasoconstritores em células endoteliais (BRANDES, 2005).

Sabe-se da existências de isoformas da COX: a ciclooxigenase-1 (COX-1), dita constitutiva, e presente na maioria das células, exercendo funções fisiológicas e a ciclooxigenase-2 (COX-2), isoforma induzida, estimulada principalmente em processos inflamatórios em diferentes tipos celulares, comumente associada ao processo de envelhecimento (ANTMAN et al. 2005; PATRONO, 2016; LUOU et al. 2016).



**Figura 3: Possíveis mecanismos envolvidos na disfunção endotelial induzida pelo envelhecimento.** Em azul, reduzido no envelhecimento: produção de óxido nítrico (NO), L-arginina e substratos da eNOS, cofatores da eNOS: tetrahydrobiopterina (BH4), expressão e/ou atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), quinases que fosforilam a eNOS. Em vermelho, aumentado no envelhecimento: atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), degradação da L-arginina por arginases, produção de tromboxano (TXA<sub>2</sub>), produção de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Elaborada pelo autor).

As combinações desses mecanismos em graus variados (**Figura 3**) determinam a lesão endotelial mediada pelo envelhecimento vascular.

### 3. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

Categorizada como uma síndrome inflamatória sistêmica (SINGER, 2016), a sepse é uma disfunção orgânica ameaçadora à vida que ocorre em decorrência de uma resposta imune desregulada à infecção, sendo classificada conforme **Tabela 1**. Seu reconhecimento precoce e tratamento adequado são fatores primordiais para o bom prognóstico do paciente.

As principais variáveis fisiopatológicas determinantes no desenvolvimento da sepse são as características do agente infectante (carga e virulência) e do hospedeiro (fatores ambientais, genéticos, estado imunológico, comorbidades e idade). Assim, em situações em que o hospedeiro é incapaz de conter a infecção primária, ocorre a progressão do processo inflamatório (ANGUS 2013; RUSSEL, 2006).

<b>Classificação (Sepsis 3)</b>	<b>Definição</b>
Infecção sem disfunção	Infecção suspeita ou confirmada, sem disfunção orgânica
Sepse	Infecção suspeita ou confirmada e um aumento agudo de $\geq 2$ pontos no SOFA
Choque séptico	Sepse + necessidade de vasopressor para elevar a pressão arterial média acima de 65 mmHg e lactato $> 2$ mmol/L (18 mg/dL) após reanimação volêmica adequada

**Tabela 1: Classificação da sepse.** (Elaborada pelo autor).

O início de uma resposta imunológica é caracterizado pelo reconhecimento de receptores sensíveis ao microrganismo infectante denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs) dentre eles, a família de TLRs (do inglês *Toll-like receptors*). Tal reconhecimento, não somente ativa o macrófago à degradação interna do agente infectante, mas também promove o estímulo à secreção de citocinas, quimiocinas que participam na indução da resposta inflamatória, que por sua vez, auxilia a conter a infecção (BALDWIN Jr. AS, 2001; LEWIS, 2016). Esse processo pode ser induzido por agentes infecciosos e seus produtos, como peptídeogliganos de bactérias gram-positivas ou por lipopolissacarídeo de

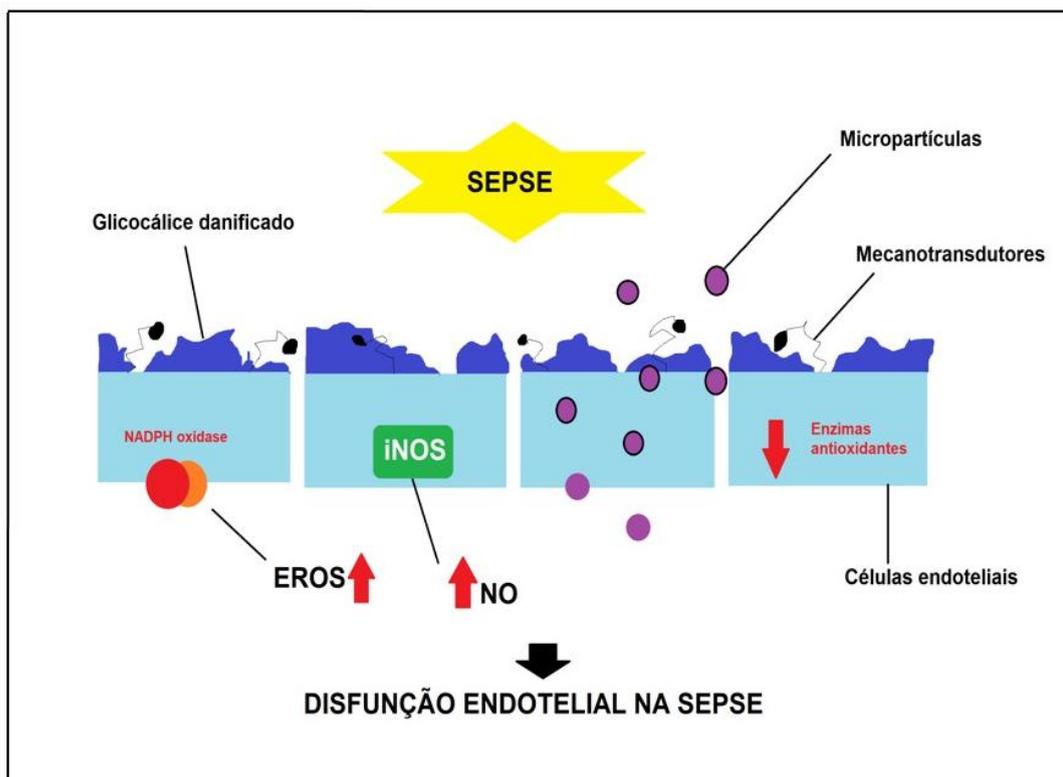
membrana (LPS) de bactérias gram-negativas. A ativação de receptores TLRs em células do sistema imune estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, bem como quimiocinas, como a quimiocina ligante 1 e 2 (CXCL1 e CXCL2 respectivamente) (MOGENSEN, 2009; CASTOLDI, 2012).

O quadro clínico da sepse é resultante da resposta inflamatória sistêmica, que sofre variações importantes em função de fatores como, por exemplo, as comorbidades coexistentes, internações repetidas e prolongadas, redução da imunidade, uso concomitante de medicamentos e envelhecimento (NASA, 2012). A presença de disfunções orgânicas, habitualmente no sistema nervoso central, cardiovascular, renal, hepático, respiratório, além de alterações na coagulação, são resultados da desregulação de importantes mecanismos ativados no contexto de uma infecção (SHANKAR-HARI, 2016).

Vários distúrbios vasculares são encontrados na sepse, tais como aumento da permeabilidade, diminuição da resistência vascular periférica (HENKIN et al. 2009; EVANS, 2018), potencialização da agregação plaquetária e ativação/agregação de células de defesa (BATISTA, 2011). A sepse está associada à disfunção grave das células endoteliais, levando à desregulação da hemostasia e da reatividade vascular, bem como ao edema tecidual (INCE, 2016). As alterações endoteliais relacionadas à sepse devem ser consideradas adequadas para limitar a propagação bacteriana, bem como orquestrar o recrutamento de células de defesa (JOFFRE, 2020). No entanto, as modificações vasculares graves e / ou persistentes associados a sepse, podem contribuir para um fluxo sanguíneo microcirculatório prejudicado, hipoperfusão de tecidos e falência de órgãos com risco de vida.

Dentre os prejuízos endoteliais mediados pela sepse (**Figura 4**), destacamos a perda da integridade do glicocálice, intensificada na presença de oxidantes, citocinas e endotoxinas bacterianas (ZUUBIER, 2005; RUBIO-GAYOSSO, 2006). O glicocálice medeia vários processos fisiológicos importantes, como a função de barreira vascular, hemostasia, adesão de leucócitos e plaquetas, transmissão de tensão de cisalhamento para o endotélio e defesas anti-inflamatórias e antioxidantes (WEINBAUM, 2007; INCE, 2016). Seu dano, resulta em **(1)** aumento na liberação de produtos do endotélio como o NO, via hiperatividade da iNOS ou endotelina (ET) (FORNI, 2005), contribuindo para alteração da reatividade vascular; **(2)** interrupção da função de barreira, que está associada à formação de edema (RUBIO-

GAYOSSO, 2006); **(3)** exposição de moléculas de adesão, que iniciam a adesão dos leucócitos, levando à transmigração para os tecidos (MANTZARLIS, 2017); **(4)** e ativação de compostos hemostáticos em direção a um estado pró-trombótico e anti-fibrinolítico, que pode levar à trombose microvascular disseminada e isquemia de órgão (INCE, 2016). Todas essas modificações contribuem fortemente para a falência de órgãos induzida pela sepse.



**Figura 4: Mecanismos de disfunção endotelial na sepse.** Destruição do glicocálice; exposição de mecanotransdutores; produção de EROS via NADPH oxidase; aumento de NO via iNOS ; redução de enzimas antioxidantes; presença de micropartículas.

Notavelmente operante, as EROs (**Figura 4**) como peróxido de hidrogênio, ânions hidroxila e superóxido, resultante de processos oxidativos da mitocôndria, xantina oxidase, NADPH oxidase e eNOS desacoplada, danificam as células endoteliais e alteram a função do endotélio na sepse (MANTZARLIS, 2017). Também responsável em aumentar as EROs, as micropartículas (**Figura 4**), moléculas compostas por lipídios e proteínas de membrana, são capazes de causar hiporreatividade vascular, amplificação da resposta hemostática, contribuindo, ainda mais, com a disfunção endotelial (REID, 2012).

A ativação do SRAA também é observado na sepse (DU CHEYRON, 2003; SCHRIER, 2004; SALGADO, 2009). A enzima conversora de angiotensina (ECA) e seu produto, a ANG II, parecem estar associadas com a patogênese da disfunção

endotelial (BOLDT, 1998), além de aumentar a permeabilidade microvascular e causar edema (NEWTON, 2005; SALGADO, 2009). Seu mecanismo de ação está associado ao aumento da volemia e pressão arterial, preservando assim, o volume e tônus vascular (BURCHER, 2001; DU CHEYRON, 2003). Estudos anteriores, mostram que os níveis plasmáticos e teciduais de ANG II estão aumentados na sepse, entretanto, acredita-se que parte dos efeitos biológicos vasculares são reduzidos diante a alta produção de citocinas, NO e estímulo à liberação de prostanóides (HIGUCHI, 2007; SALGADO, 2009).

As prostaglandinas são importantes mediadores e moduladores da resposta inflamatória e imunológica à infecção (METZ, 1990; NÉMETH, 2008). Acredita-se que na sepse, participam da patogênese do colapso hemodinâmico, falência de órgãos e do intenso processo inflamatório (ARONOFF, 2012). Seus mecanismos associados a vasodilatação sistêmica parecem estar envolvidos com pior prognóstico e maior mortalidade por sepse (CULP, 1971; ARONOFF, 2012).

Além dos fatores supracitados envolvidos na disfunção endotelial mediada pela sepse, as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) também parecem estar envolvidas, pois apesar de promoverem mecanismo de defesa do hospedeiro contra a infecção, contribuem para lesão do endotélio e prejuízo da perfusão microvascular (CAMICIA, 2014). Ademais, sabe-se que a geração de NETs pode estar associada com o aumento de DNA livre circulante de células (do inglês, *cell free DNA/ cfDNA*) (MARUCHI, 2018), considerado uma mistura de fragmentos de DNA liberados de células apoptóticas e necróticas de diferentes tecidos, que permanecem circulando no sangue (SUN, 2015). Concentrações aumentadas de cfDNA plasmático são encontradas em várias condições clínicas, incluindo sepse, trauma, câncer, e acidente vascular cerebral (LO, 2000; RAINER, 2003; DAWSON, 2013; ZEERLERDER, 2003). O aumento de cfDNA está associado com a disfunção endotelial (JOHANSSON, 2018) e parece forte preditor de injúria orgânica e prognóstico para sepse (JOHANSSON, 2018; LIAO, 2020).

Desta forma, fica evidente que o sistema vascular é protagonista na resposta sistêmica à infecção e ao início da falência de órgãos (JOFFRE, 2020). A disfunção endotelial induzida pela sepse é multifacetada, com diferentes mecanismos moleculares, justificando a necessidade de melhor compreensão dos processos fisiopatológicos que medeiam a síndrome inflamatória. A melhor caracterização da disfunção endotelial, permitiria futuros alvos terapêuticos visando vias patogênicas

específicas e proporcionando uma assistência mais direcionada.

#### **4. SEPSE E O ENVELHECIMENTO**

O envelhecimento é fator de risco reconhecido de sepse. Os pacientes idosos apresentam maior propensão à disfunção microvascular e consequente falência multiorgânica, apresentando, dessa forma, letalidade significativamente maior quando comparado aos pacientes mais jovens (TUCSEK, 2013). Estudos sugerem que as alterações no endotélio relacionadas à idade contribuem para o aumento da mortalidade por sepse em animais idosos (SAITO, 2001; YAMAMOTO, 2002; STARR, 2010).

Colleta, 2014, mostrou que a disfunção endotelial, evidenciada tanto por estudos funcionais, através de medidas do relaxamento dependente do endotélio, quanto pela medição de múltiplos índices plasmáticos de disfunção de células endoteliais, é de início precoce e particularmente grave em camundongos idosos submetidos a sepse. O envelhecimento exacerba a disfunção de múltiplos órgãos e a mortalidade em modelo de sepse em roedores, caracterizado, por um grau significativo de disfunção endotelial, mediante o aumento do estresse oxidativo e resposta reduzida em curva de acetilcolina em artéria aorta (COLLETA, 2014). Os achados, reforçam a hipótese que a lesão endotelial aguda induzida pela sepse em pacientes idosos, esteja ocorrendo em um endotélio que está, em maior ou menor grau, já danificado, gerando assim, impacto no prognóstico do paciente.

Há evidência disponível na literatura, que demonstra que a sepse e seu fator de risco precedente (envelhecimento), compartilham características comuns da disfunção endotelial, caracterizada pela perda do equilíbrio da funcionalidade do endotélio (BERMEJO-MARTIN, 2018). Como ocorre na sepse, o envelhecimento promove um estado pró-inflamatório, pró-oxidativo e pró-coagulação dos vasos sanguíneos, favorecendo alterações do tônus vasomotor, ativação plaquetária e adesão e transmigração leucocitária (COLLETA, 2014; INCE, 2016; UNGVARI, 2018). Além disso, o envelhecimento prejudica a capacidade regenerativa do endotélio, contribuindo com a geração de um grau basal de falência de órgãos (KONUCOGLU, 2017; BERMEJO-MARTIN, 2018). Todos esses fatores, contribuem para um cenário de “fragilidade endotelial” precedente à sepse.

É notável, que a presença de disfunção endotelial prévia associada à idade, pode representar, um fator predisponente para o desenvolvimento de uma disfunção

vascular mais severa, dentro do contexto de infecção, contribuindo para maior grau de falência de orgânica.

Pequenos estudos clínicos evidenciaram que métodos de monitorização da disfunção microcirculatória, através de microscopia intravital ou de biomarcadores plasmáticos específicos, em idosos com sinal de infecção, pode prever ou detectar a sepse (COLBERT, 2016). Recentemente, foi observado que pacientes idosos com infecção, que realizam o uso combinado de antimicrobianos com drogas que protegem o endotélio, pode prevenir o desenvolvimento de sepse ou melhorar o desfecho da síndrome inflamatória quando estiver presente (BERMEJO-MARTÍN, 2018). Choudhury, 2015, mostrou que a combinação de atorvastatina e imipenem, melhora as funções vasculares e a sobrevida em animais submetidos a sepse. Esses achados, corroboram com a hipótese que o endotélio vascular é determinante nos processos fisiopatológicos que envolvem a sepse e o envelhecimento, tornando-o um potencial alvo terapêutico para tratamento de pacientes idosos com sepse.

Há uma carência de informações na literatura sobre o impacto da sepse sobre envelhecimento vascular, sobretudo, as vias patogênicas específicas que agravam a funcionalidade do endotélio. Modelos experimentais de sepse animal e estudos in vitro, apesar de suas limitações, permitem um melhor entendimento das múltiplas vias induzidas no endotélio vascular em resposta à infecção e sua regulação específica, possibilitando conhecimento mais detalhado das vias de ativação que levam à disfunção endotelial induzida pela sepse.

Nosso trabalho, busca entender as vias potencialmente envolvidas na disfunção vascular mediada pela sepse sob uma condição basal de dano vascular associado ao envelhecimento. Para assim, viabilizar o manejo de medidas de proteção ao endotélio.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

Investigar os efeitos da sepse sobre a reatividade vascular no contexto do envelhecimento, em um modelo experimental de sepse estafilocócica do ponto de vista funcional e molecular.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

#### **2.2.1 Determinar a letalidade do modelo de sepse moderada:**

Através do acompanhamento e análise do tempo estimado de sobrevivência dos camundongos após indução da sepse.

#### **2.2.2 Determinação das concentrações plasmáticas de DNA livre circulante:**

Através de método de fluorescência com corante nuclear fluorescente, 24 horas após a indução da sepse.

#### **2.2.3 Avaliação do desempenho funcional de artérias aorta**

Através da dissecação de artérias com incubação farmacológica *in vitro* avaliamos:

- a. A reatividade vascular a agentes vasoconstritores e vasodilatadores;
- b. A liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio, especificamente, o óxido nítrico, prostanóides derivados da ciclooxigenase, espécies reativas de oxigênio e mediadores do sistema renina-angiotensina.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

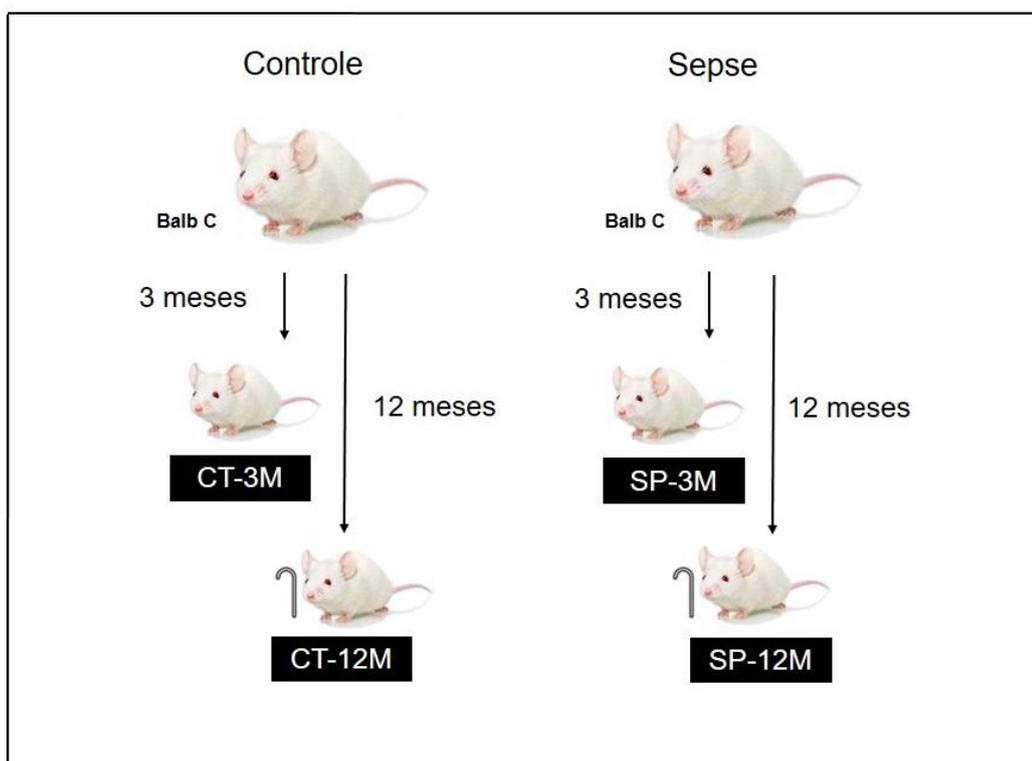
#### 3.1 Grupos de Estudo

Para avaliar os mecanismos da sepse sobre o envelhecimento vascular, utilizamos o modelo de senescência cronológica de camundongos (COSTA, 2016), pertencentes à raça Balb c. Utilizamos os animais nas idades 3 meses e 12 meses. Todos foram mantidos em temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas / 12 horas (luzes acesas às 7 horas).

Os animais foram alojados em grupos de 4 durante a fase de aclimação e foram fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES 03/2018), que segue as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

Para a realização deste estudo, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (**Figura 5**):

- Controle: 3 meses (CT 3M) e 12 meses: (CT 12M).
- Sepse: 3 meses (SP 3M) e 12 meses: (SP 12M).



**Figura 5: Esquema de grupos experimentais.** Para a realização deste estudo, os camundongos da raça Balb C, foram divididos em 4 grupos experimentais. Animais do grupo Controle (CT) com 3

meses (3M) e 12 meses (12M) de idade e animais do grupo Sepsis com 3 meses (3M) e 12 meses (12M) de idade (Elaborado pelo autor).

### 3.2 Modelo de sepsis experimental

O quadro de sepsis foi induzido por meio de inoculação intraperitoneal de suspensões de *Staphylococcus Aureus* sensível à meticilina (MSSA). A linhagem de *S. aureus* (ATCC 25923) utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana do Departamento de Patologia – UFES, onde encontrava-se estocada a -20°C em meio TSB (caldo de soja tripton) acrescido de 20% de glicerol. Quando necessário, a cultura estoque foi ativada por esgotamento em ágar sangue e incubada à 37 °C por 16 horas.

Para avaliar o perfil de crescimento da linhagem de *S. aureus* utilizada, e saber qual o tempo seria necessário para que a linhagem atingisse a fase exponencial de crescimento, uma colônia isolada foi ressuspensa em caldo Mueller Hinton e a densidade óptica (DO) foi ajustada em 0,1 a 620 nm. O volume de 100 µL da suspensão bacteriana preparada foi transferido para microplaca de fundo chato e incubada à 37 °C por 12 horas. A leitura da DO<sub>620</sub> foi realizada por um leitor de microplaca a cada 60 minutos.

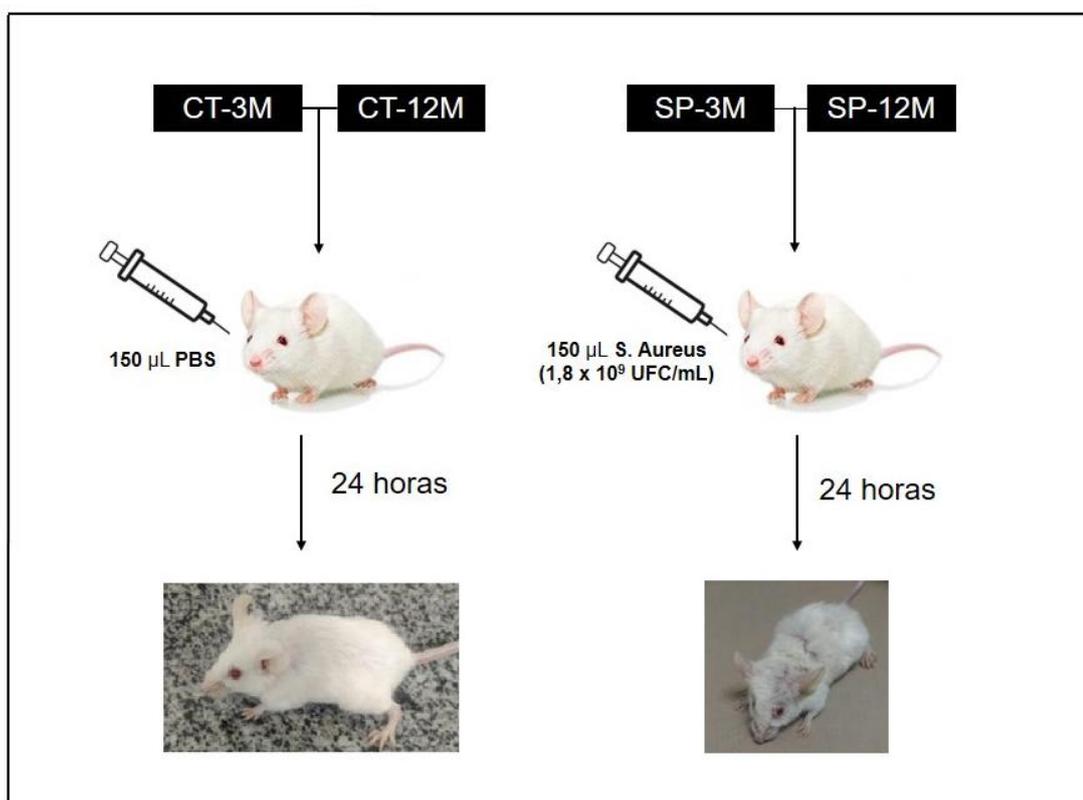
Para o preparo das suspensões de *S. aureus* utilizadas nos testes subsequentes, a cultura estoque foi ativada em ágar sangue e incubada à 37 °C. Após 16 horas, colônias isoladas de *S. aureus* foram ressuspensas em microtubo contendo 1,5 mL de caldo Mueller Hinton, e desse, foram retirados 200 µL para realização da leitura da DO<sub>620</sub>. Após a leitura, foram registrados os valores da DO<sub>620</sub> e realizado os cálculos para preparo de uma suspensão com a DO<sub>620</sub> de 0,1 em tubos com 5 ml de caldo Mueller Hinton (Fórmula:  $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$ ).

Os tubos de ensaio contendo com 5 ml da cultura de *S. aureus* na DO<sub>620</sub> de 0,1 foram mantidos dentro da estufa bacteriológica a 37°C por 4,5 horas, tempo necessário para que a cultura atingisse a fase exponencial de crescimento. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 14000 rotações por minuto (RPM) por 5 minutos. Posteriormente o sobrenadante da cultura foi retirado, e o aglomerado de bactérias presentes no fundo do tubo foi ressuspensa em Tampão fosfato-salino (PBS) e a DO<sub>620</sub> foi ajustada para 1,0.

Para conhecer a concentração de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes em 1 mL da suspensão bacteriana preparada previamente (DO<sub>620</sub> = 1,0).

O volume de 100  $\mu\text{L}$  da amostra foi diluído seriadamente (1:9) em PBS estéril, e posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi plaqueada na superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas, e após esse período as UFCs foram então quantificadas.

Por fim, a suspensão bacteriana com  $\text{OD}_{620} = 1,0$  ( $1,8 \times 10^9$  UFC/mL) em fase exponencial de crescimento foi administrada, via intraperitoneal, 150  $\mu\text{L}$  da preparação nos animais do grupo sepse, enquanto aos animais do grupo controle uma mesma quantidade foi administrada, porém, de solução PBS estéril (**Figura 6**). A sepse foi estudada após 24 horas de indução, atingindo o escore clínico de sepse grave.



**Figura 6: Modelo de sepse por inoculação estafilocócica.** Amostras de *Staphylococcus Aureus* (*S. Aureus*) foram preparadas e inoculadas na cavidade intraperitoneal de animais do grupo Sepse com 3 meses (3M) e 12 meses (12M) de idade. Para animais do grupo Controle (CT) com 3 meses (3M) e 12 meses (12M) de idade, foi administrado solução tampão fosfato-salino (PBS) (Elaborado pelo autor).

### 3.2.1 Escore clínico da sepse

Baseado no escore publicado por Araújo, em 2012, após 24 horas de indução da sepse o escore clínico foi determinado. O escore é composto por 11 itens, em que a presença ou ausência de cada um deles pontuava 1 ou 0, conforme a **tabela 2** abaixo:

ITENS	PRESENÇA (1) AUSÊNCIA (0)
Pieloereção	
Lacrimação ou fechamento palpebral	
Abdome contraído	
Frequência respiratória alterada	
Capacidade de explorar o ambiente alterada	
Perda de alerta ao escape	
Alterações locomotoras	
Alterações da fezes	
Alteração da temperatura corporal	
Diminuição da força ao agarrar	
Turgor comprometido	
<b>SOMA</b>	

**Tabela 2.** Escore clínico para estratificar a sepse em modelo animal.

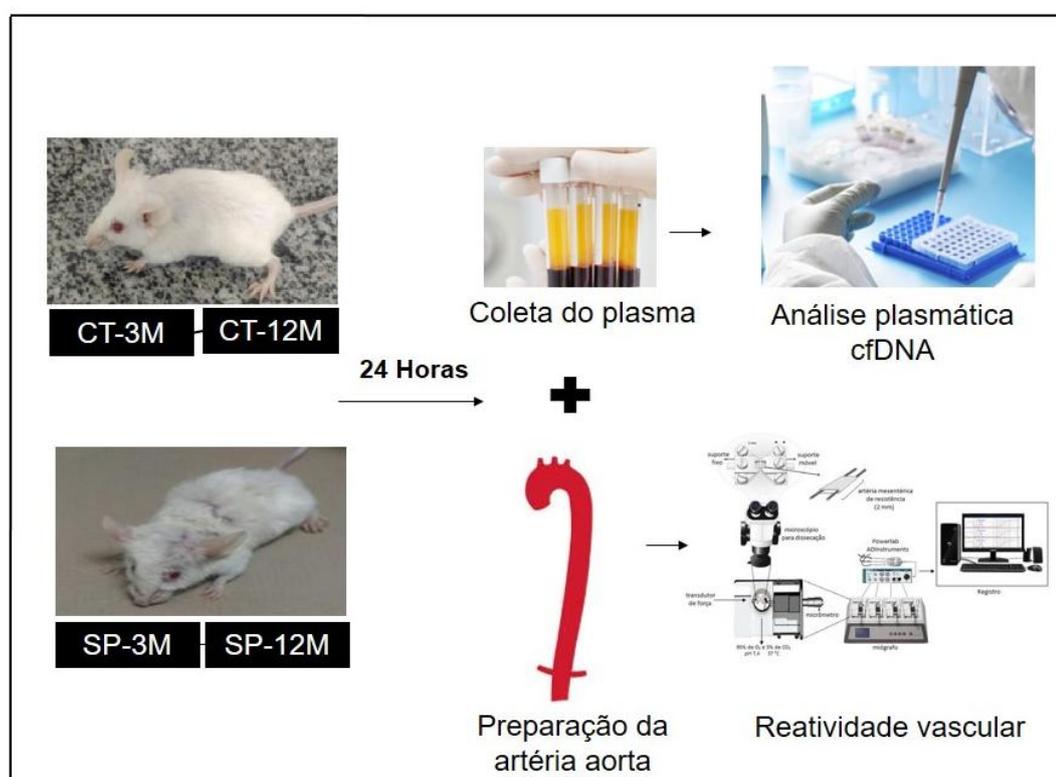
Os animais com escore 0 eram considerados saudáveis. Sepse leve para escore  $\leq 3$ , sepse moderada escore 4-7, sepse grave escore 8-11. Para este estudo trabalhamos com animais que apresentaram pontuação para sepse moderada, avaliada 24 horas após a indução da sepse.

### 3.3 Curva de sobrevivência

Para avaliação da sobrevivência os camundongos dos 4 grupos experimentais foram monitorados a cada 8 horas durante 48 horas após a indução da sepse. Durante esse período os animais tiveram livre acesso à água e ração. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de sobrevivência.

### 3.4 Concentração plasmática de DNA livre circulante

As concentrações plasmáticas de cfDNA, foram medidas no plasma coletado após 24 horas da indução da sepse (**Figura 7**). Os animais foram previamente anestesiados e exsanguinados pelo método de punção cardíaca. As amostras de sangue foram centrifugadas a 10.000g por 20 minutos a 4 ° C, e após a separação do plasma, este foi armazenado em freezer a -80 ° C para análise subsequente. Após o descongelamento, como eles foram homogeneizados por cerca de 30 segundos utilizando o agitador vórtex. Uma curva padrão com sete concentrações foi gerada por diluição de DNA de esperma de salmão comercial (Sigma-Aldrich). A curva foi avaliada em triplicatas resultando em curvas padrão usadas para calcular as concentrações de DNA. As concentrações cfDNA foram analisadas com um corante nuclear fluorescente (SYBR Gold) nas amostras. Resumidamente, o SYBR Gold (diluição 1: 10.000 em PBS) foi adicionado ao plasma em 96 poços negros. A fluorescência foi registrada usando um fluorômetro Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, EUA) com um comprimento de onda de excitação de 485nm e comprimento de onda de 535nm (GOLDSTEIN e colaboradores, 2009).



**Figura 7: Análise plasmática das concentrações de DNA livre circulante de células (cfDNA).** Após 24 horas de indução da sepse moderada, os animais dos grupos Sepse (SP) e Controle (CT)

com 3 meses (3M) e 12 meses (12M) de idade, foram anestesiados e exsanguinados. Amostras do plasma foram colhidas para análise da concentração plasmática de cfDNA e a artéria aorta foi preparada para técnica de reatividade vascular (Elaborado pelo autor).

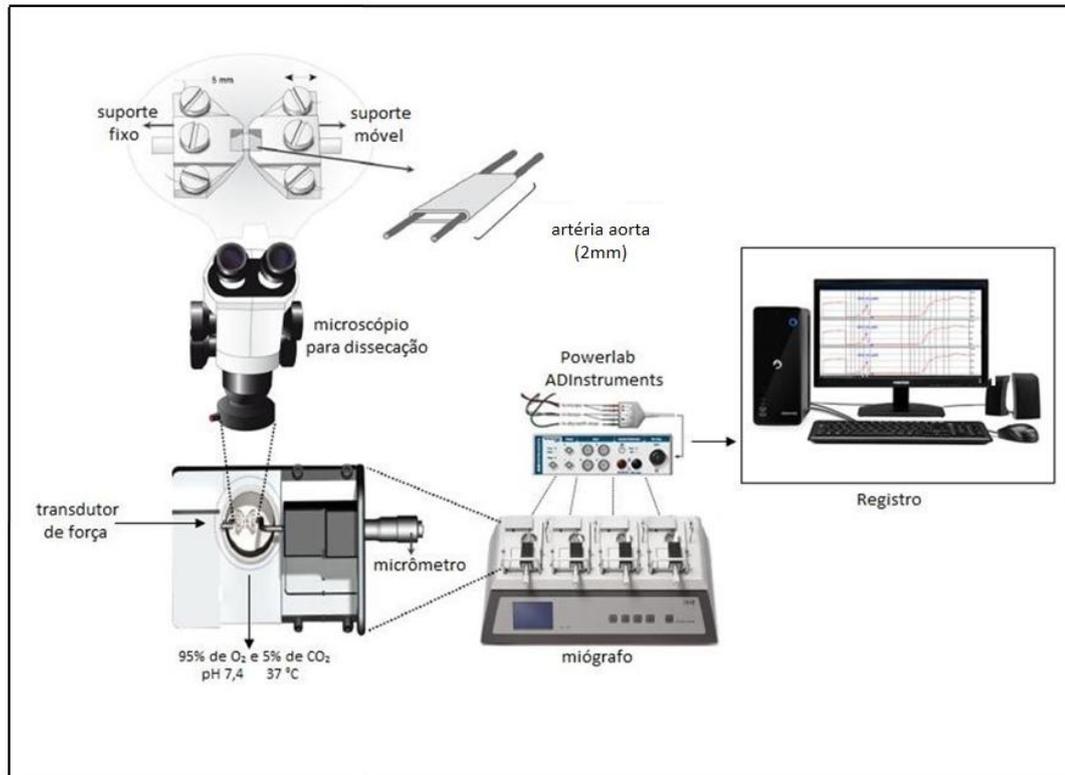
### 3.5 Reatividade vascular

A análise da reatividade vascular da artéria aorta foi realizada de acordo com método descrito por Mulvany & Halpern (1977).

Após 24 horas de indução da sepse, os camundongos foram anestesiados com cetamina (70 mg.kg<sup>-1</sup>, intraperitoneal, Agener - União Brasil) e xilazina (10 mg.kg<sup>-1</sup>, intraperitoneal, Bayer, a Brasil). A artéria aorta foi cuidadosamente dissecada, mantida em solução de Krebs Henseleit a 4°C (em mM: NaCl 115; NaHCO<sub>3</sub> 25; KCl 4,7; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; 52 glicose 11,1 e Na<sub>2</sub>EDTA 0,01) e aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> a 4°C em de pH 7.4. Todo tecido adiposo foi removido. Com o auxílio de um microscópio de dissecação, segmentos de, aproximadamente, 2 mm de longitude foram cortados e mantidos a 4°C. Após preencher as câmaras do miógrafo com Krebs Henseleit, dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias para medida de força isométrica (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca). Um dos fios estava acoplado a um transdutor de força isométrica e o outro fio conectado a um micromanipulador que permitia o estiramento das artérias. Esse miógrafo estava conectado a um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e a um computador (**Figura 8**).

Posteriormente, as artérias foram estabilizadas por um período de 30 minutos em solução de Krebs-Henseleit, gaseificada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, pH 7,4) e mantida à temperatura de 37° C. Transcorrido o período de estabilização, as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão:diâmetro interno foi calculado e a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado in situ ( $L_{100}$ ) foi determinada (Mulvany & Halpern, 1977). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna  $L_1$ , calculada como  $L_1 = 0,90 \times L_{100}$ , circunferência na qual o desenvolvimento de força é

máximo (Mulvany & Halpern, 1977).



**Figura 8:** Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de artéria aorta para realização de estudos de reatividade vascular *in vitro*.

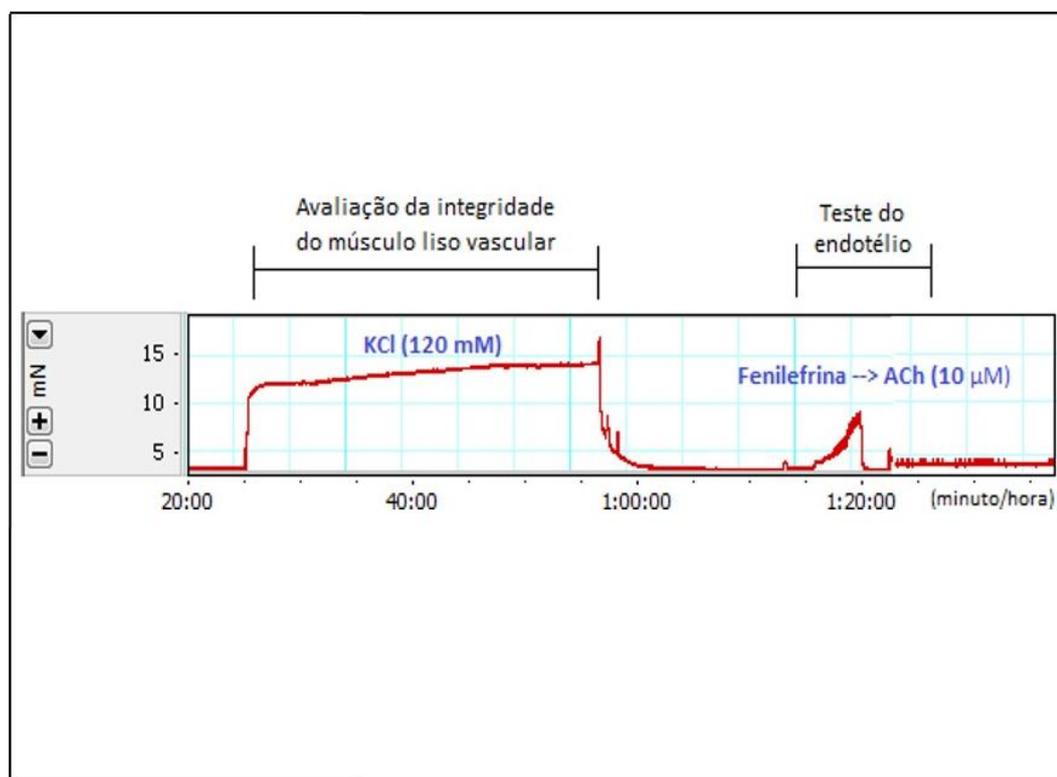
### 3.5.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio

Após o período de estabilização, foi adicionado cloreto de potássio (KCl) 120 mM ao banho, para verificar a atividade contrátil induzida por despolarização e, assim, avaliar a viabilidade do músculo liso vascular. Após 30 minutos de estabilização, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração, os anéis foram lavados três vezes para que retornassem à tensão de repouso. Depois de 30 minutos esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio (**Figura 9**).

### 3.5.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

Para comprovar a integridade endotelial, as artérias foram pré-contraídas com uma concentração de fenilefrina (FE) suficiente para produzir 50% da contração produzida pela solução de Krebs-Henseleit com KCl 120 mM, e então o relaxamento vascular foi obtido por exposição a 10  $\mu$ M de ACh. Somente foram utilizadas nesse

estudo as artérias com relaxamento superior a 80% da contração induzida pela FE. Posteriormente, esses anéis foram submetidos aos diferentes protocolos experimentais, incubados por 30 minutos com fármacos de interesse, para análise de curvas concentração- resposta (**Figura 9**).



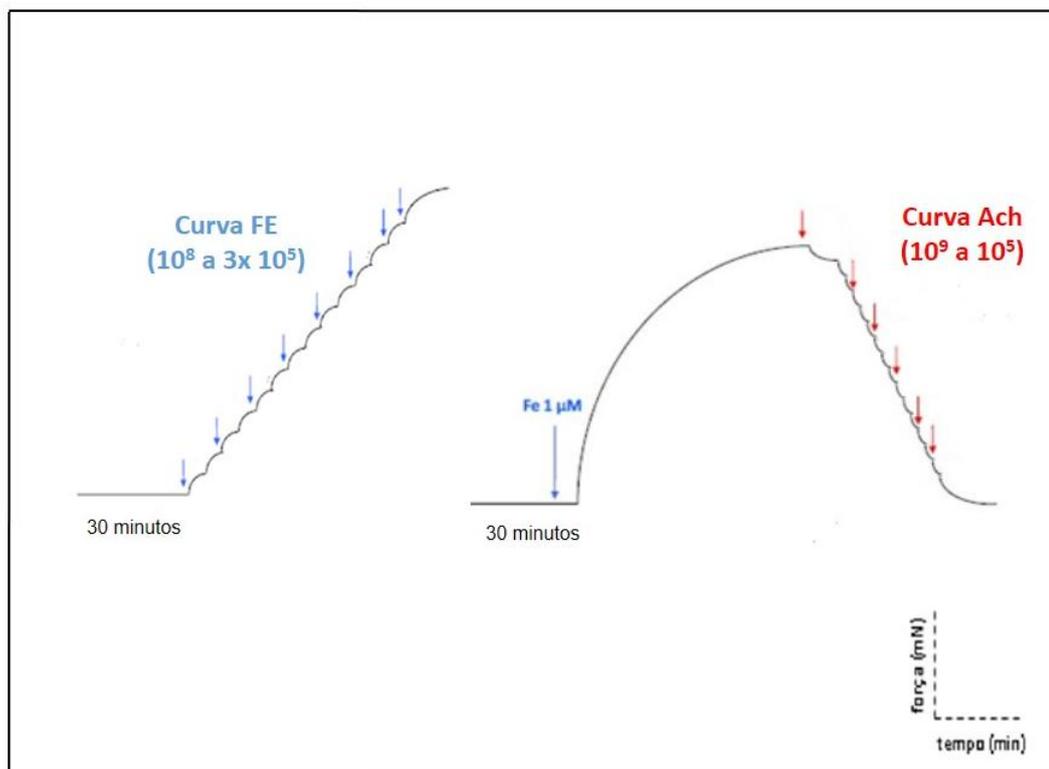
**Figura 9:** Registro com curvas do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e da avaliação da integridade funcional do endotélio. (KCl: cloreto de potássio; ACh: acetilcolina).

### 3.5.3 Efeitos da sepse na resposta contrátil a fenilefrina e vasodilatadora à acetilcolina em artérias aorta

Após a avaliação da integridade do músculo liso e do endotélio, utilizando-se fenilefrina (FE), agonista alfa-adrenérgico, em concentrações crescentes ( $10^8$  a  $3 \times 10^5$ ) aplicadas ao banho, foi verificado se a sepse afeta a responsividade vascular constritora (**Figura 10**). O efeito frente a esta concentração crescente de FE foi normalizado em função da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (120 mM) (**Figura 9**).

Para estudar o efeito do tratamento sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio, foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina ( $10^9$  a  $10^5$ ), nos anéis previamente contraídos com fenilefrina  $1 \mu\text{M}$  após obtido o platô (**Figura**

10).



**Figura 10:** Esquema representativo dos protocolos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe) e acetilcolina (Ach) após estabilização de 30 minutos (Adaptado de Batista,2014).

### 3.5.4 Participação do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio, dos prostanóides e do sistema renina angiotensina aldosterona na resposta contrátil a fenilefrina e vasodilatadora à acetilcolina em artérias aorta

Para avaliar se a sepse altera a participação do óxido nítrico, os anéis de aorta foram incubados com inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 10 μM) e inibidor da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), o Aminoguanidina (50 μM). A participação das espécies reativas de oxigênio, foi avaliada através da tempol (10 μM), um mimético da superóxido dismutase (SOD).

Para verificar se a sepse altera a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico/ciclooxigenase, os anéis isolados de aorta, foram incubados com indometacina (10 μM), um inibidor inespecífico da ciclooxigenase.

Ainda, a fim de investigar a participação do SRAA, foi realizado a incubação das

artérias aorta com a presença de Losartan (10  $\mu$ M), bloqueador dos receptores angiotensinoginérgicos (AT)<sub>1</sub>.

### **3.6 Análise Estatística dos Dados**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do número de animais usados em cada experimento (n). Nos casos de comparação entre duas médias usamos o teste t de Student.

A curva sobrevivência ao longo do tempo foi ilustrada através do método de Kaplan-Meier e o teste Log-Rank Mantel- Cox foi usado para avaliar diferenças entre as curvas sobrevivência.

As respostas vasoconstritoras e vasodilatadoras foram normalizadas pela resposta contrátil ao KCl (120 mM) e expressa em percentagem da contração. Para cada curva de concentração-resposta, a resposta máxima (R<sub>max</sub>) e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>: -log EC<sub>50</sub>), foram calculados usando análise de regressão não linear de cada curva individualmente.

Para comparar os efeitos da incubação dos fármacos nas respostas contráteis à fenilefrina, os resultados foram expressados através da diferença da área abaixo da curva (dAUC) de concentração-resposta nas situações controle (sem fármaco) e nas situações experimentais (presença de fármacos).

Para análise dos dados e aplicação dos testes estatísticos foram utilizados os programas Microsoft Office Excel, GraphPad Prism Software 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA) e software SPSS 22.0 (BASE, [s. d.]). Os valores serão considerados significantes para um mínimo de  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

A indução da sepse provocou aumento da mortalidade em camundongos de 12 meses quando comparado aos de 3 meses.

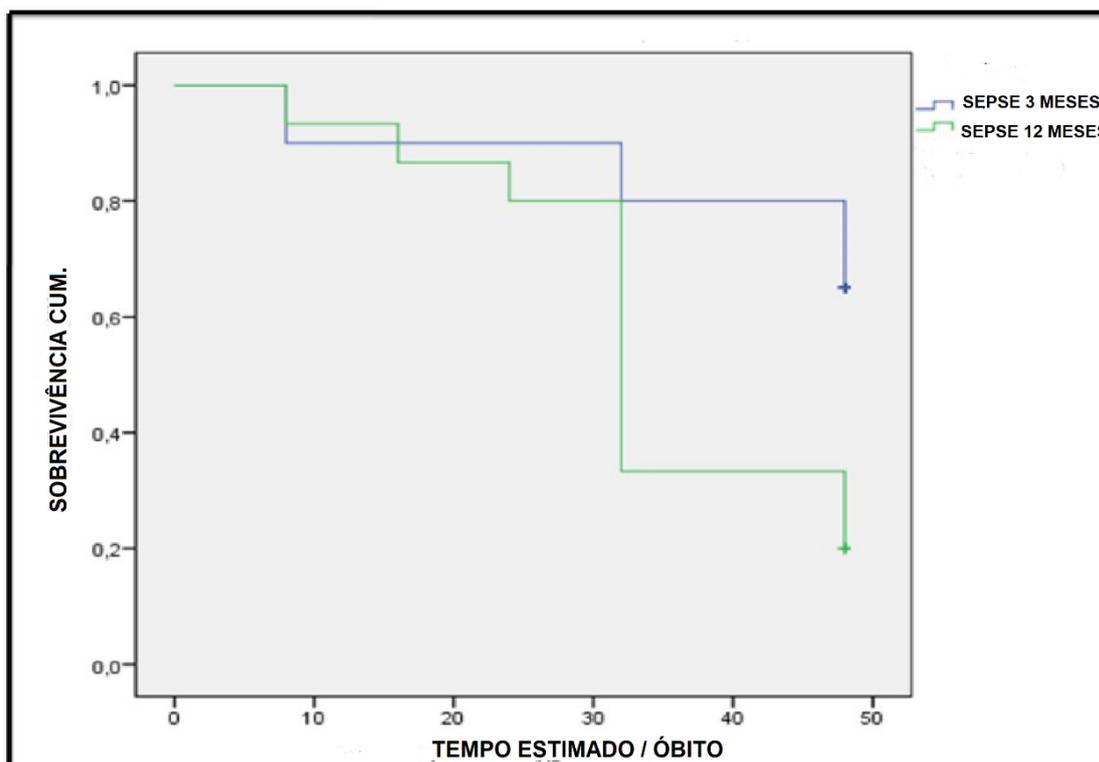


Figura 11. Avaliação da sobrevivência de animais sépticos com 3 e 12 meses. O número de animais sobreviventes foi avaliado a cada 8 horas. Os resultados evidenciam a sobrevivência cumulativa analisada pelo teste de Log- Rank Mantel Cox. (3 meses, n=20; 12 meses, n=15). \* $p > 0,05$  vs 3 meses.

### 4.2 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE DNA LIVRE CIRCULANTE (cfDNA) EM ANIMAIS DE 3 E 12 MESES APÓS 24 HORAS DE INDUÇÃO DA SEPSE

A indução da sepse aumentou o nível plasmático cfDNA circulante em camundongos de 3 meses (Figura 11A- Tabela 3) e 12 meses de idade (Figura 11B- Tabela 3). Não foi observado alteração nos níveis de cfDNA circulante relacionado somente a idade.

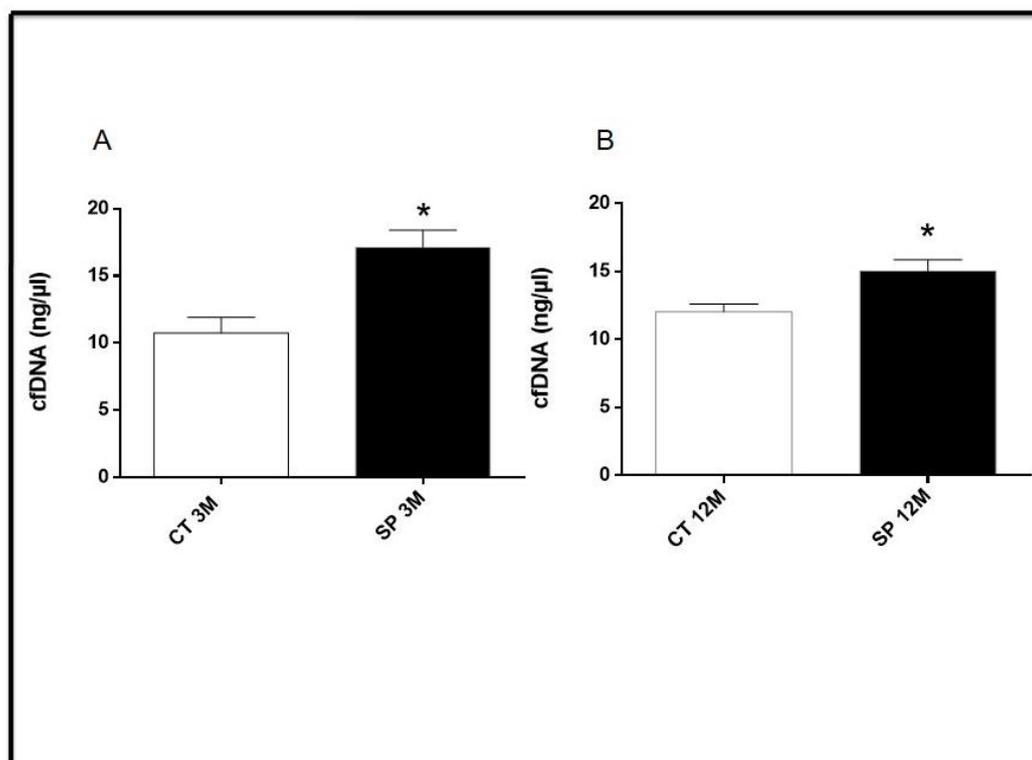


Figura 12. Nível plasmático de DNA livre circulante (cfDNA – ng/ul): (A) Camundongos do grupo controle (CT 3M) (n=8) e sepse (SP 3M) (n=8) com 3 meses. (B) Camundongos do grupo controle (CT 12M) e sepse (SP 12M) com 12 meses. Para análise comparativa foi utilizado o Teste-t não pareado. \*  $P < 0,05$ , CT vs SP.

**Tabela 3:** Níveis plasmáticos de cfDNA – ng/ul obtidos do plasma de camundongos dos grupos Controle e Sepse 3 meses (3M) e 12 meses (12M).

	3 Meses		12 Meses	
	CT	SP	CT	SP
cfDNA	10,7 ± 1,1	17,1 ± 1,2*	12,04 ± 0,2	15,03 ± 0,8*

Valores expressos como média ± EPM. \* $p < 0,05$  vs Controle, teste t de *Student*.

### 4.3 EXPERIMENTOS DE REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA

#### 4.3.1 Efeito da sepse moderada sobre a reatividade à acetilcolina em anéis isolados de aorta em camundongos de 3 meses e 12 meses

Para avaliar se a sepse moderada seria capaz de alterar o relaxamento dependente do endotélio, foram realizadas, curvas concentração-resposta a acetilcolina.

A acetilcolina promoveu relaxamento da artéria aorta de maneira concentração dependente em ambos os grupos analisados. Porém, os segmentos de aorta correspondentes aos grupos em que foi induzido a sepse mostraram um prejuízo da

função endotelial em relação ao seu controle. O grupo controle de 12 meses, apresentou disfunção endotelial basal associado a idade (COSTA, 2016), que piorou após a indução da sepse. A resposta máxima a acetilcolina foi menor no grupo submetido a sepse tanto com 3 e 12 meses (Figura 12A e B; Tabela 4).

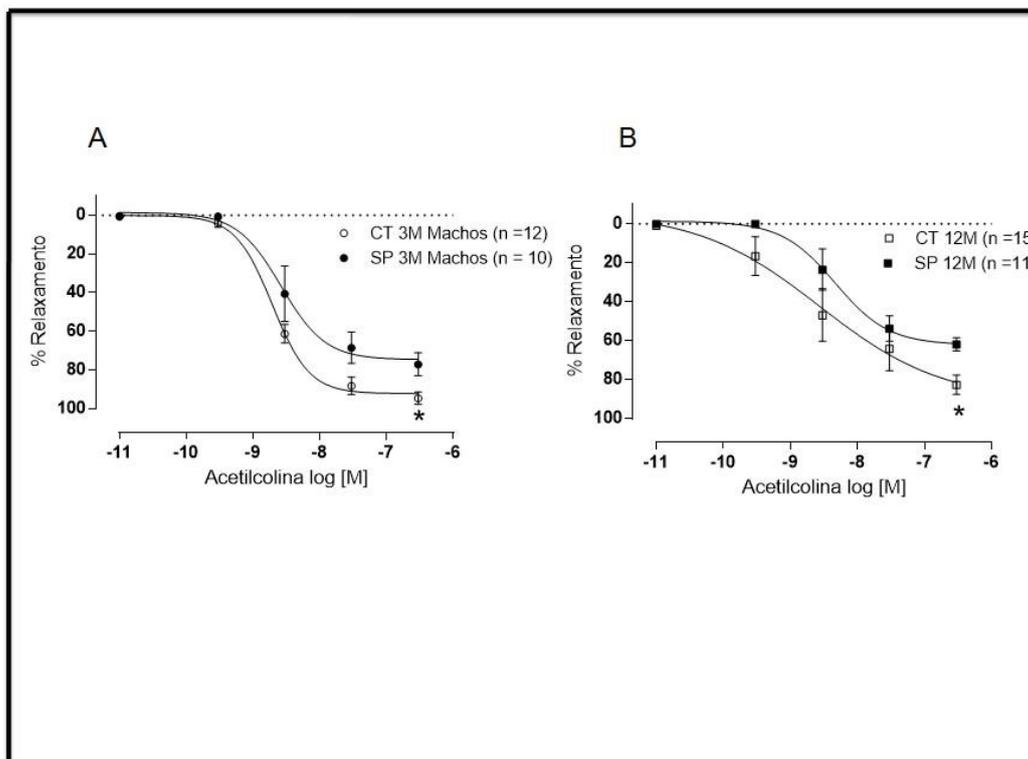


Figura 13. Resposta dilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artéria aorta de camundongos controle (CT) e sepse (SP) com 3 meses (3M) (A) e 12 meses (12M) (B). Os resultados (Média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à FE. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e da sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste t não pareado: \* $P < 0,05$ , CT vs SP.

#### 4.3.2 Efeito da sepse moderada sobre a reatividade à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos com 3 meses e 12 meses

A administração de fenilefrina aumentou de maneira concentração dependente, o tônus basal das artérias aorta dos grupos controle e sepse de 3M e 12M. Contudo, a resposta contrátil entre os grupos foi diferente. Nossos resultados demonstraram que animais envelhecidos submetidos a sepse apresentam hiporresponsividade ao vasoconstritor fenilefrina, que não foi observado em animais sépticos de 3 M (Figura 13A e B; Tabela 4 e 5).

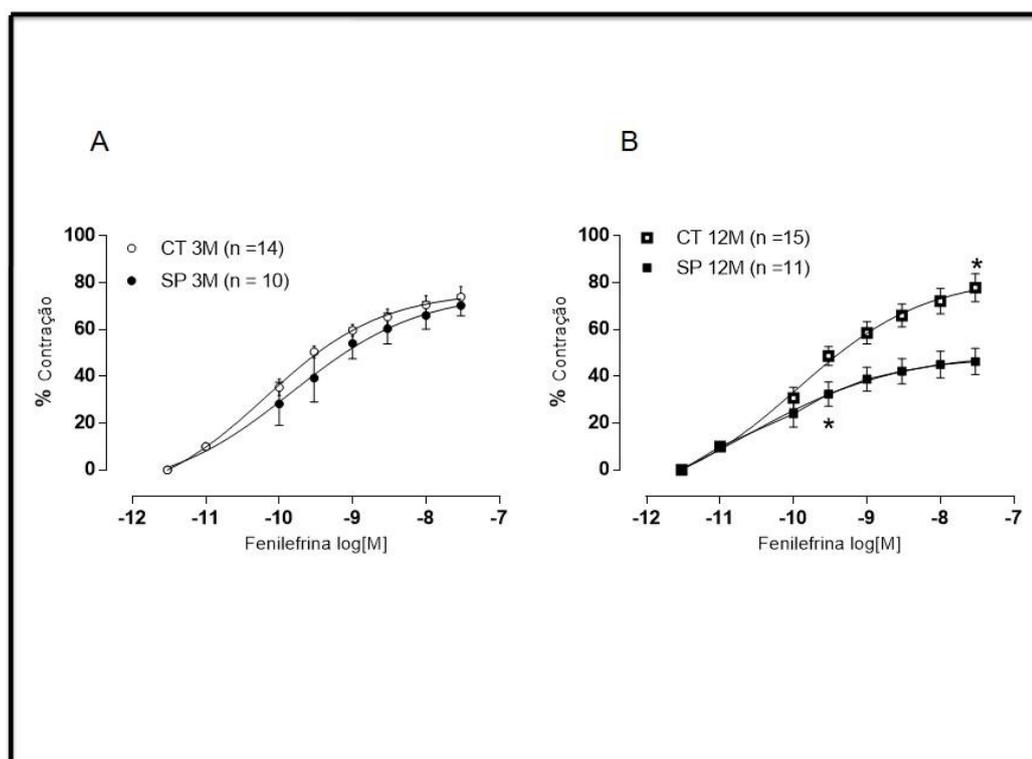


Figura 14: Efeito da sepse sobre a resposta contrátil a fenilefrina, em segmentos de artéria aorta torácica de camundongos sépticos. (A) Camundongos com 3 meses (3M) dos grupos controle (CT) e sepse (SP). (B) Camundongos com 12 meses dos grupos controle (CT) e sepse (SP). Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{max}$ ) e da sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste t não pareado: \* $P < 0,05$ , CT vs SP.

**Tabela 4:** Valores de  $pD_2$  e  $R_{max}$  obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina e fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 3 meses (3M).

	Controle 3M		Sepse 3M	
	$pD_2$	$R_{max}$	$pD_2$	$R_{max}$
Acetilcolina	$7,1 \pm 0,1$	$94,5 \pm 3,1$	$6,4 \pm 0,2^*$	$77,05 \pm 5,9^*$
Fenilefrina	$9,2 \pm 0,1$	$73,9 \pm 4,4$	$8,8 \pm 0,3$	$70,3 \pm 4,4$

Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs Controle 3M, teste t de Student.

**Tabela 5:** Valores de  $pD_2$  e  $R_{max}$  obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina e fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M).

	Controle 12M		Sepse 12M	
	$pD_2$	$R_{max}$	$pD_2$	$R_{max}$

Acetilcolina	6,7 ± 0,3	82,6 ± 4,9	5,8 ± 0,2	62,0 ± 3,4*
Fenilefrina	9,9 ± 0,1	71,4 ± 8,0	7,9 ± 0,5*	46,3 ± 5,6 *

Valores expressos como média ± EPM. \*p<0,05 vs Controle 12M, teste t de *Student*.

#### 4.3.3 Efeito da sepse moderada sobre a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos com 12 meses

Para analisar o papel do óxido nítrico na redução da resposta vasoconstritora à fenilefrina nos animais de 12 meses submetidos a sepse, segmentos arteriais com endotélio intacto foram pré-incubados com um inibidor da sintase de óxido nítrico, o L-NAME (100 µM) e em seguida a resposta contrátil a fenilefrina foi avaliada.

O L-NAME provocou aumento da sensibilidade e da resposta máxima à fenilefrina nos anéis aórticos na condição controle e séptico dos animais de 12 meses (Figura 14A e 14B, Tabela 6). Entretanto, ao comparar a magnitude deste efeito por meio da dAUC, observou-se que nos animais submetidos a sepse, a modulação dependente do NO na resposta contrátil à fenilefrina foi maior (Figura 14C). Como evidenciado pelos valores de pD<sub>2</sub> e R<sub>max</sub> (Tabela 6), o efeito da inibição da síntese de óxido nítrico com L-NAME foi diferente entre os grupos, sugerindo que a indução da sepse altera a via do NO e este parece ser um elemento responsável pelo menos parcialmente pela hiporresponsividade a fenilefrina observado nas artérias aorta de camundongos sépticos com 12M.

**Tabela 6:** Valores de pD<sub>2</sub> e R<sub>max</sub> obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M) pré-incubadas com L-NAME.

	Controle 12M		Sepse 12M	
	pD <sub>2</sub>	R <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	R <sub>max</sub>
Fenilefrina	9,9 ± 0,1	71,4 ± 8,0	7,9 ± 0,5	46,3 ± 5,6
L-NAME	9,8 ± 0,1	89,6 ± 0,8*	9,8 ± 0,1*	73,8 ± 2,0*

Valores expressos como média ± EPM. \*p<0,05 vs Fenilefrina, teste t de *Student*.

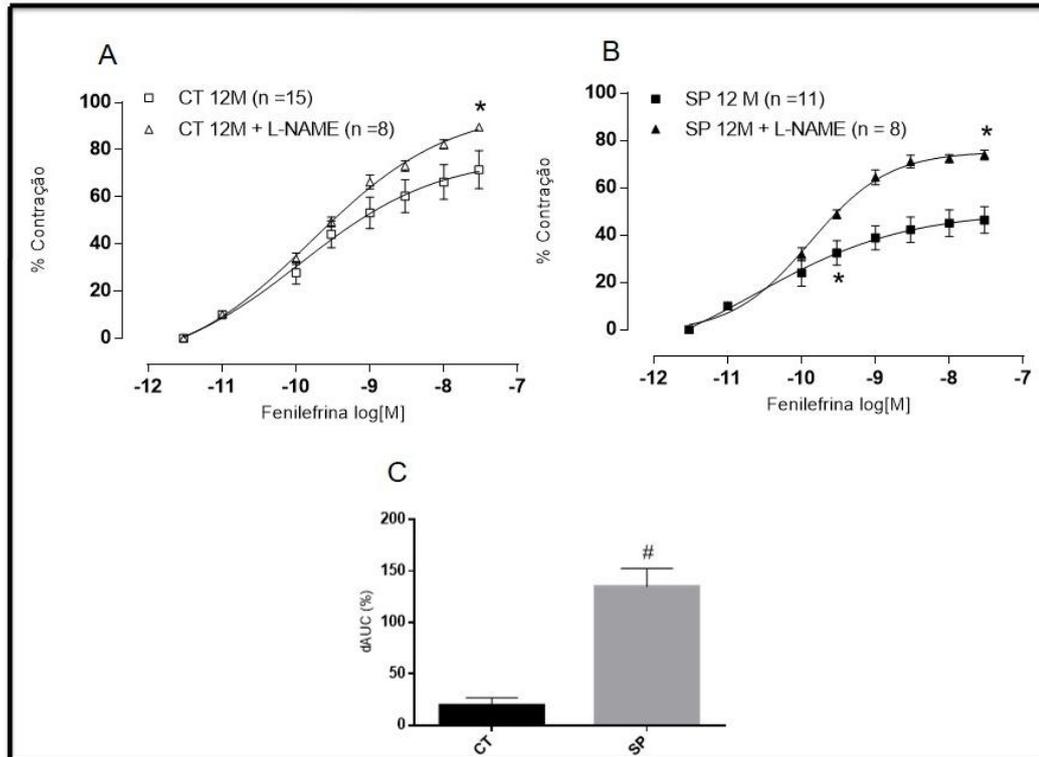


Figura 15: Efeito do L-NAME (100  $\mu$ M), inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta de camundongos dos grupos controle (CT) (A) e submetidos a sepse (SP) (B). Em C, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em aorta, de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), sensibilidade ( $pD_2$ ) e dAUC foi utilizado o Teste-t não pareado. \* $P < 0,05$  CT/ SP vs LNAME. #  $P < 0,05$  CT vs SP.

Sabemos que o aumento da atividade da iNOS é uma possível via para liberação de produtos do endotélio como o NO, sobretudo na sepse, participando na disfunção endotelial e disfunção de múltiplos órgãos em modelos de animais submetidos a síndrome inflamatória (FORNI, 2005; COLLETA, 2014). Assim, nosso próximo passo, foi avaliar a participação da iNOS na reatividade vascular à fenilefrina em artérias aorta de camundongos de 12M, na condição controle e sepse. Os anéis de aorta foram pré-incubados com aminoguanidina (50  $\mu$ M), inibidor da enzima iNOS.

A aminoguanidina, promoveu aumento na resposta máxima (Figura 15; Tabela 7) à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos de 12M submetidos a sepse.

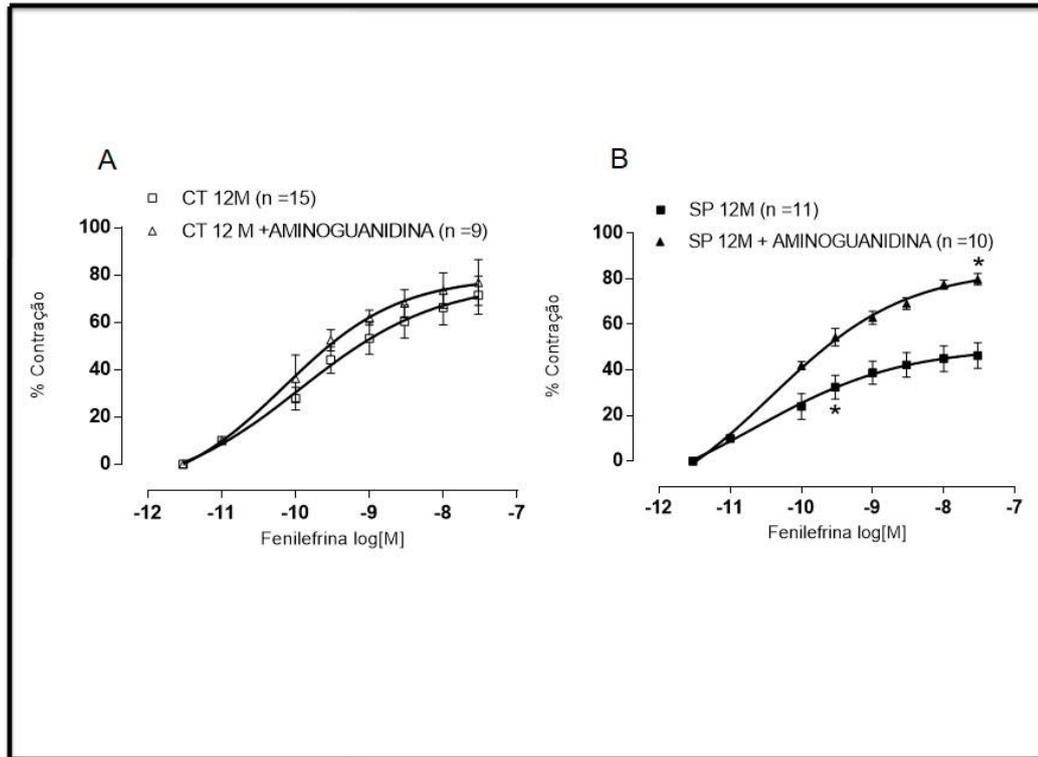


Figura 16: Efeito do inibidor da iNOS, Aminoguanidina, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artéria aorta de camundongos dos grupos controle (CT) (A) e submetidos a sepse (SP) (B) em anéis de aorta. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{\max}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste-t não pareado. \* $P < 0,05$  CT/SP vs Aminoguanidina. & $P < 0,05$  CT vs SP.

**Tabela 7:** Valores de  $pD_2$  e  $R_{\max}$  obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M) pré-incubadas com aminoguanidina.

	Controle 12M		Sepse 12M	
	$pD_2$	$R_{\max}$	$pD_2$	$R_{\max}$
Fenilefrina	$9,9 \pm 0,1$	$71,4 \pm 8,0$	$7,9 \pm 0,5$	$46,3 \pm 5,6$
Aminoguanidina	$9,9 \pm 0,1$	$76,8 \pm 3,9$	$10,3 \pm 0,1^*$	$79,8 \pm 2,4^*$

Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs Fenilefrina, teste t de Student.

#### 4.3.4 Efeitos da sepse moderada sobre a participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxygenase na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos com 12 meses

Para investigar se a sepse altera a participação dos prostanóides derivados da via

do ácido araquidônico-ciclooxigenase na hiporresponsividade à fenilefrina em em aorta e animais de 12M, incubamos essas artérias com o inibidor da COX, a indometacina (10  $\mu$ M). Demonstramos que nos animais sépticos a indometacina promoveu aumento da resposta contrátil e sensibilidade (pD2) à fenilefrina (Figura 16B, Tabela 8), enquanto que na condição controle, houve redução dá resposta contrátil (Figura 16A, Tabela 8). Estes resultados sugerem que nos animais de 12M submetidos a sepse moderada existe maior participação dos prostanóides vasodilatadores derivados da ciclooxigenase na resposta a fenilefrina, enquanto que no grupo controle prevalece a ação de prostanóides vasoconstritores.

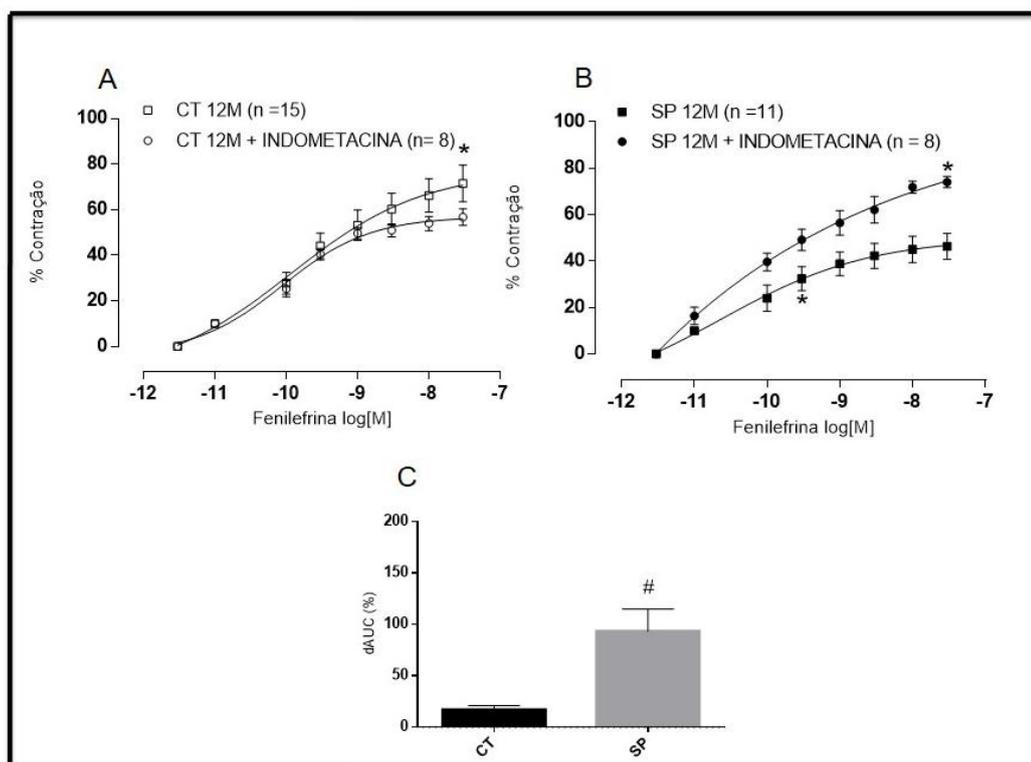


Figura 17: Efeitos da indometacina (10  $\mu$ M), inibidor da ciclooxigenase, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de aorta de camundongos na condição controle (CT) (A) e submetidos a sepse (SP) (B). Em C, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em aorta de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) foi utilizado o Teste-t não pareado. \* P<0,05 CT/SP vs Indometacina. # P<0,05 CT vs SP.

**Tabela 8:** Valores de pD<sub>2</sub> e R<sub>máx</sub> obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M) pré-incubados com indometacina.

	Controle 12M		Sepse 12M	
	pD <sub>2</sub>	R <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	R <sub>max</sub>
Fenilefrina	9,9 ± 0,1	71,4 ± 8,0	7,9 ± 0,5	46,3 ± 5,6
Indometacina	9,6 ± 0,1	56,7 ± 3,6*	10,4 ± 0,2*	74,02 ± 2,3*

Valores expressos como média ± EPM. \*p<0,05 vs Fenilefrina, teste t de *Student*.

#### 4.3.5 Efeitos da sepse moderada sobre a participação de espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos com 12 meses

Para verificar a influência da produção de espécies reativas de oxigênio, visto sua relação com estado pró-oxidativo de vasos sanguíneos e maior letalidade em modelos animais submetidos a sepse (COLLETA, 2014; INCE, 2016; UNGVARI, 2018), incubamos em anéis de aorta, o tempol (10 µM), um mimético do superóxido dismutase.

Notamos que na presença de tempol, ambos as condições controle e sepse apresentaram redução na resposta vasoconstritora. Demonstramos que no grupo controle o tempol promoveu redução da resposta contrátil e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) à fenilefrina (Figura 17A, Tabela 9) enquanto que no grupo sepse, apenas a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) foi alterada (Figura 17B, Tabela 9). Maior magnitude de efeito foi observada no grupo controle de 12 meses (Figura 17C).

**Tabela 9:** Valores de pD<sub>2</sub> e R<sub>max</sub> obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M) pré-incubados com tempol.

	Controle 12M		Sepse 12M	
	pD <sub>2</sub>	R <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	R <sub>max</sub>
Fenilefrina	9,9 ± 0,1	71,4 ± 8,0	7,9 ± 0,5	46,3 ± 5,6
Tempol	9,0 ± 0,09*	54,2 ± 1,8*	6,5 ± 0,3*	34,1 ± 4,9

Valores expressos como média ± EPM. \*p<0,05 vs Fenilefrina, teste t de *Student*.

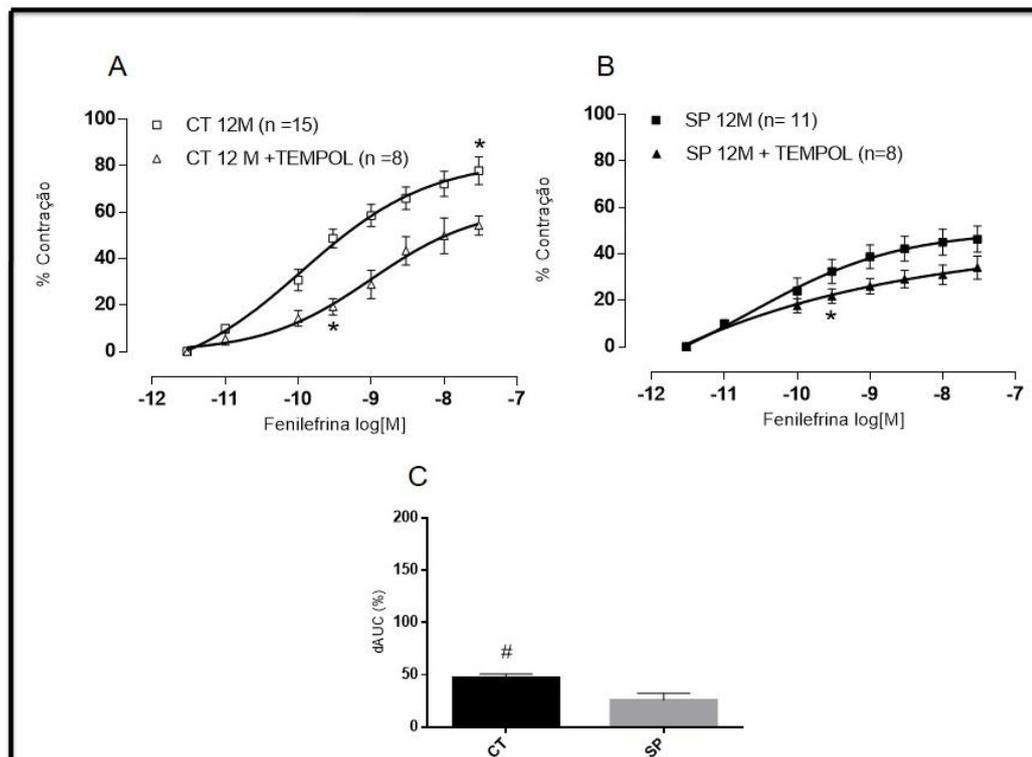


Figura 18: Efeitos do Tempol (10  $\mu$ M), mimético da superóxido dismutase, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de aorta de camundongos da condição controle (CT) (A) e submetidos a sepse (SP) (B). Em C, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em aorta de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) foi utilizado o Teste-t não pareado. \* P<0,05 CT/SP vs Tempol. # P<0,05 CT vs SP.

#### 4.3.6 Efeitos da sepse moderada sobre a participação do sistema renina angiotensina aldosterona na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos com 12 meses

Para investigar a atuação do SRAA sobre a alteração da resposta contrátil a fenilefrina observada nos animais sépticos de 12M foi utilizado o losartan, um bloqueador dos receptores AT<sub>1</sub> (10  $\mu$ M). Demonstramos que nos animais de 12M submetidos a sepse (Figura 18B; Tabela 10) o losartan promoveu redução da resposta contrátil à fenilefrina, sem promover alterações em aortas da condição controle (Figura 18A; Tabela 10). Esses resultados sugerem a participação de mediadores vasoconstritores do SRAA na sepse moderada de animais de 12M.

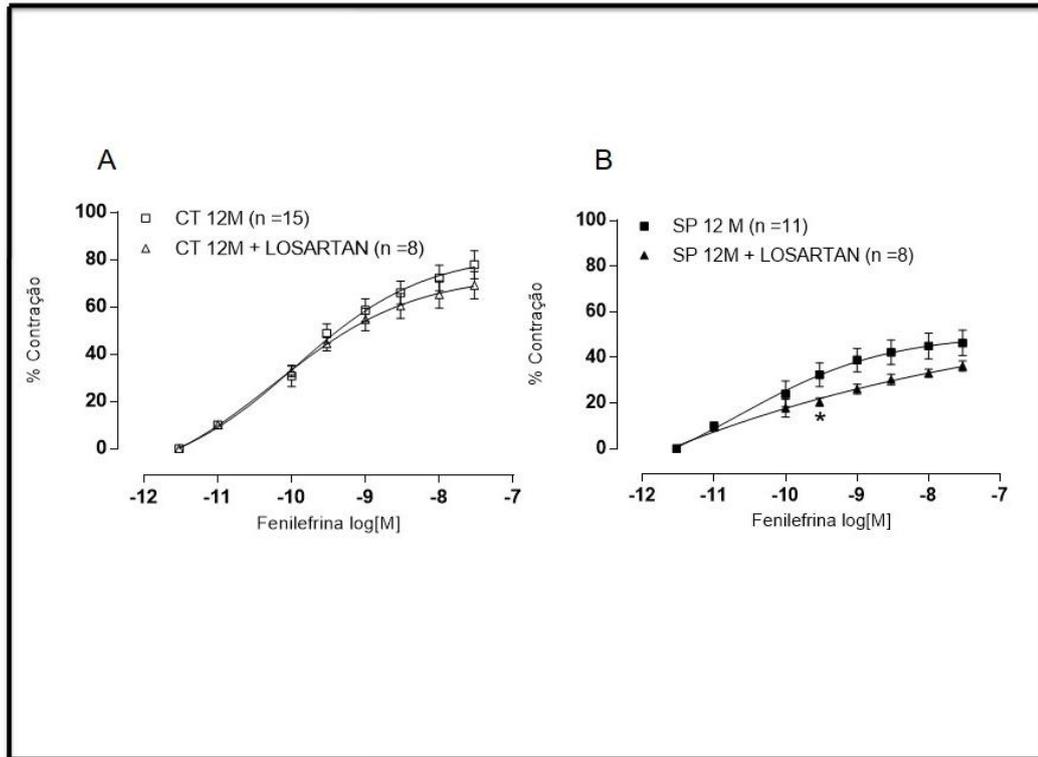


Figura 19: Efeitos do Losartan ( $10 \mu\text{M}$ ), bloqueador de receptores AT<sub>1</sub>, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de aorta de camundongos dos grupos controle (CT) (A) e submetidos a sepse (SP) (B). Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste-t não pareado. \*  $P < 0,05$  CT/SP vs Losartan.

**Tabela 10:** Valores de  $pD_2$  e  $R_{\text{máx}}$  obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de camundongos dos grupos Controle e Sepse 12 meses (12M) pré-incubados com losartan.

	Controle 12M		Sepse 12M	
	$pD_2$	$R_{\text{máx}}$	$pD_2$	$R_{\text{máx}}$
Fenilefrina	$9,9 \pm 0,1$	$71,4 \pm 8,0$	$7,9 \pm 0,5$	$46,3 \pm 5,6$
Losartan	$10,4 \pm 0,2$	$69,1 \pm 5,7$	$6,6 \pm 0,2^*$	$36,2 \pm 2,2$

Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs Fenilefrina, teste t de Student.

## 5 DISCUSSÃO

A sepse é uma complicação comum e frequentemente fatal em pacientes internados em UTIs, sobretudo em idosos, em que o envelhecimento atua como fator de risco reconhecido (TUCSEK, 2013). Dentre vários prejuízos dessa condição, a disfunção endotelial aparece como protagonista aos mecanismos associados à insuficiência múltipla de órgãos e aumento da mortalidade (VALLET, 2003; COLLETA, 2014; INCE, 2016; UNGVARI, 2018). Modelos de sepse relevantes e bem caracterizados podem fornecer informações valiosas sobre os mecanismos fisiopatológicos e ser um meio para descoberta de novos alvos e avaliação de estratégias terapêuticas. A sepse por inoculação é amplamente utilizada para estudar disfunções cardiovasculares e caracterização de vias inflamatórias (PRICE, 1999; FREISE, 2001; SOERENSEN, 2013; OLIVEIRA, 2015; BADEA, 2019). Além disso, estudos clínicos têm demonstrado que as causas de sepse por bactérias gram-positivas vêm aumentando, sendo responsáveis por 50% dos casos de sepse grave ou choque séptico em UTIs (YI, 2009; OLIVEIRA, 2015). O *S. aureus* está entre esses microorganismos e é a principal causa de sepse entre as bactérias gram-positivas (OLIVEIRA, 2015). Nosso trabalho utilizou um modelo de peritonite infecciosa causada pela inoculação de *S. aureus* em cavidade peritoneal. Este modelo foi capaz de induzir sepse moderada em camundongos após 24 horas de sua indução, como observado pelos sinais clínicos quantificados e comprovação de disfunção endotelial. Foi ainda observado um aumento da taxa de mortalidade nos animais sépticos de 3 e 12 meses em relação a condição controle, sendo que esta mortalidade foi significativamente maior no grupo dos idosos.

Na sepse, o aumento de cfDNA circulante, representa um padrão molecular de dano celular, que está associado com a disfunção endotelial, (JOHANSSON, 2018) e contribui consideravelmente para insuficiência múltipla dos órgãos e progressão da sepse (CHENG, 2020). Estudos clínicos já demonstram níveis significativos de fragmentos de DNA, derivados de bactérias patogênicas no plasma de pacientes sépticos, caracterizando o cfDNA como forte preditor de injúria orgânica, bem como, importante ferramenta auxiliar para diagnóstico e prognóstico da sepse (JOHANSSON, 2018; LIAO, 2020). Estudos em um modelo de peritonite séptica em camundongos, também sugerem que o cfDNA é um bom indicador de prognóstico na sepse (XIN, 2016). Nossos resultados, demonstraram aumento

significativo nos níveis plasmáticos de cfDNA em animais submetidos a sepse, que reforçam que o nosso modelo foi eficaz em desenvolver uma infecção sistêmica nestes animais.

Como já mencionado neste trabalho, a sepse traz importante impacto no sistema cardiovascular uma vez que reduz a capacidade do sistema vascular em manter o tônus e induzindo hipotensão arterial, resultando em inadequada perfusão sanguínea e oxigenação (HENKIN et al. 2009; INCE, 2016; EVANS, 2018). Grande parte dos pesquisadores estudam a fisiopatologia da sepse em animais jovens-adultos, através de modelos experimentais, como o método de ligadura e punção do ceco, mais utilizado e considerado padrão ouro, por representar um modelo de infecção polimicrobiana (MISHRA, 2018). Entretanto, o método supracitado apresenta desvantagens quanto ao controle da severidade da sepse, quando comparado com o métodos de inoculação (ASANO, 2015).

A disfunção multiorgânica associada a hiporresponsividade vascular e hipoperfusão tecidual observadas em animais e humanos acometidos pela sepse e sua correlação com a mortalidade, não é novidade (SIBBALD, 1991; TERBORG, 2001; HEIN, 2005; HENKIN et al. 2009; DUFFY, 2011 MISHRA, 2018 EVANS, 2018). Contudo, surpreendentemente, até o momento, existe escassez de estudos que busquem elucidar tais modificações vasculares na sepse em condições de envelhecimento, em outras palavras, pouco se sabe dos mecanismos associados a disfunção vascular em populações idosas que desenvolvem a sepse, mesmo diante a tendência demográfica de mudança em direção ao envelhecimento da população no Brasil e no mundo (GOTTS, 2016).

Raros estudos experimentais como de Colleta, 2014, avaliaram a função vascular de animais idosos submetidos a sepse, demonstrando que em uma sepse grave, a disfunção endotelial é particularmente precoce e com pior desfecho. O presente estudo, é o primeiro a demonstrar que uma sepse moderada por inoculação de *S. aureus* promove hiporresponsividade vascular à fenilefrina apenas nos grupos de animais envelhecidos, enquanto que não foi observado alterações na resposta contrátil de animais jovens submetidos à sepse. Essas alterações observadas e associadas com a maior letalidade, também vista no mesmo grupo de animais, corroboram diferentes estudos que demonstram a correlação entre dano vascular e mortalidade (HEIN, 2005; DUFFY, 2011; COLLETA, 2014).

A literatura relata de forma consistente o aumento da atividade da NOS em

modelos sépticos (PALMER, 1993; ZHOU, 1997; FISCHER, 1999). Vários estudos experimentais demonstram que a inibição da NOS reverte a hipotensão e contratilidade vascular anormal em grupos de animais jovens-adultos submetidos a sepse (JULOU-SCHAEFFER, 1990; GRAY, 1991; FERNADES, 2008; NIN 2011). Reforçando a hipótese de que o excesso de produção de NO pode contribuir ao tônus vascular anormal na sepse. Ao levar em consideração nossos resultados, referentes aos animais envelhecidos sépticos, observamos que na presença de L-NAME ocorreu uma reversão do efeito de hiporresponsividade a um estímulo vasoconstritor observado no animais idosos submetidos a sepse. Ao utilizarmos um inibidor mais seletivo, como a aminoguanidina, o mesmo foi observado, sugerindo que a iNOS participa do aumento do efeito de hipocontratibilidade observado na sepse moderada estafilocócica em animais envelhecidos.

O papel do NO derivado da iNOS no tecido vascular durante a sepse, está relacionado à disfunção vascular (LIAUDET, 2013; SCHESCHOWITSCH, 2015) e contribui para alta taxa de mortalidade de pacientes sépticos (MAYR, 2013). Embora tenha sido amplamente estudado nas últimas décadas, os mecanismos envolvidos na iniciação e desenvolvimento de disfunção vascular séptica é pouco compreendido, sobretudo em modelos de envelhecimento (COLLETA, 2014). Nossos resultados sugerem que o efeito anti-contrátil (de hipocontratibilidade) observado em animais envelhecidos submetidos à sepse moderada tem participação importante da via da iNOS, podendo impactar diretamente na mortalidade dos animais. Acreditamos ainda, que o fator envelhecimento, atua como preditor para pior progressão da disfunção vascular e desfecho clínico, haja visto que animais jovens submetidos à sepse moderada não apresentaram hiporresponsividade à agentes vasoconstritores e apresentaram taxa de mortalidade significativamente menor.

Os prostanóides também podem estar intimamente relacionados com a hiporresponsividade vascular provocada pela sepse, uma vez que são importantes moduladores do tônus vascular tanto em condições fisiológicas, como fisiopatológicas (LOPEZ, 2017). No presente estudo, observamos que o uso de indometacina reverteu a ação anti-contrátil observada nas curvas fenilefrina-dependentes do grupo experimental com 12 meses. Esses resultados sugerem a presença significativa de prostanóides vasodilatadores intermediando a hiporresponsividade vascular observada em animais envelhecidos submetidos a

sepsis moderada. O aumento dos níveis de prostanoídes vasodilatadores, em modelos de sepsis experimental ou estudos clínicos com pacientes sépticos, já foi documentado (RIEDO, 1990; BERNARD, 1991; BERNARD, 1997; WANG, 2000; ARONOFF, 2012). A PGI<sub>2</sub> é produzida pelo endotélio e músculo vascular, pela ação da enzima COX e prostaciclina sintase (PGIS), causando agregação plaquetária (DORRIS, 2012) e vasodilatação mediada por AMPc (NARUMIYA, 1999; PARKINGTON, 2004). A produção de PGI<sub>2</sub> aumenta na inflamação e contribui para a vasodilatação (LAMB DEN, 2018). Uma ampla gama de estressores inflamatórios e PAMPs, incluindo IL-1, TNF- $\alpha$ , hipóxia e LPS, provocam aumento da síntese de PGI<sub>2</sub> (STUART, 1984; ENDO, 1988; RIEDO, 1990), que leva à disfunção vascular (LAMB DEN, 2018). Já a PGE<sub>2</sub>, também vasodilatadora, é considerada importante mediador liberado por macrófagos e células apresentadoras de antígeno durante a resposta inflamatória (BROGLIATO, 2012). Sua produção inibe a proliferação e induz apoptose de células T (MASTINO, 1992; RUGGERI, 2000). Ademais, atenua a proliferação de células B imaturas (GARRONE, 1994) e inibe fagocitose de macrófagos, impactando assim, a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos (SEREZANI, 2007). Nossos achados sugerem modulação da via da COX, e que, a presença de prostanoídes vasodilatadores é exclusivo da condição de sepsis, visto que, animais controle de 12 meses apresentaram, opostamente, redução da resposta contrátil em curvas fenilefrina-dependentes. Sugerindo que, o grupo controle, possui maior interface com prostanoídes vasoconstritores, que corrobora com estudos em modelos de envelhecimento vascular (COSTA, 2016).

O aumento da atividade da COX está associado com pior desfecho clínico e mortalidade (CULP, 1971; GOLDMANN, 2010; ARONOFF, 2012). Vários estudos experimentais demonstram o aumento da atividade dessa enzima em modelos de sepsis (SHORT, 1981; BONE 1987; MACK, 2000; GOLDMANN, 2010; BROGLIATO, 2012). Estudo de Awata, 2019, demonstrou aumento dos níveis de PGI<sub>2</sub> em amostras de tecido vascular e que o bloqueio da COX, com indometacina, em anéis de aorta, reverte a hiporresponsividade à fenilefrina observada em animais sépticos. Nossos achados corroboram com estudos da literatura, sugerindo assim, que a via da COX em nosso modelo de sepsis estafilocócica moderada, pode impactar na disfunção vascular e no pior prognóstico de animais envelhecidos. Ensaios terapêuticos clínicos, com inibição de COX frente ao evento séptico, são escassos e se mostram inconclusivos até o momento, quanto ao impacto no prognóstico e

mortalidade por sepse (HAUPT, 1991; BERNARD,1997; ARONS,1999; MEMIS, 2004). Notavelmente, há necessidade de estudos clínicos maiores, que contemplem grupos mais definidos, combinações terapêuticas e momentos de terapia, conforme quadro clínico, e sobretudo, que utilizem a riqueza de estudos experimentais que apoiam essa abordagem.

A sepse não só produz fatores vasodilatadores, mas também fatores de contração como o  $O_2^-$  (MANTZARLIS, 2017; ATAWA, 2019). Igualmente, o envelhecimento está associado com o aumento de EROS e conseqüentemente com a geração do estresse oxidativo (EL ASSAR, 2013), peça importante no desenvolvimento da disfunção endotelial. Em ambas as condições supracitadas, o dano vascular impacta na circulação e disfunção orgânica. Fontes implicadas na geração de EROS, incluem enzimas da NADPH oxidase, sintase de NO desacoplada, mitocôndria, xantina oxidase, ciclooxigenases e até as lipooxigenases (HUET, 2011; MANTZARLIS, 2017; LAMBDEN, 2018). O  $O_2^-$ , uma das principais moléculas reativas de oxigênio, em condições de equilíbrio, rapidamente é convertido pela SOD em peróxido de hidrogênio e este, é reduzido à água pela via antioxidante da glutathione (PARAVICINI, 2008; YUYUN,2018). O equilíbrio entre a produção e eliminação de EROS é crucial para sobrevivência da célula, entretanto, não é o observado tanto em condições de envelhecimento quanto de sepse. O aumento da produção de EROS e geração do estresse oxidativo foi detectado durante o processo de envelhecimento em diferentes leitos vasculares que inclui aorta (HAMILTON, 2001; MARMOL, 2007; UNGVARI, 2011) e coronárias (CSISZAR, 2003) de ratos além de aortas de camundongo (FRANCIA, 2004), induzindo redução da biodisponibilidade de NO. Da mesma forma, diferentes estudos de sepse experimental demonstram aumento do estresse oxidativo em leitos vasculares (HAIDARA, 2010; COLLETA, 2014; DE SOUZA, 2016).

Em nosso estudo, ao utilizarmos o tempol, um mimético da SOD, corroborando com a literatura, observamos a participação de vias oxidantes na condição controle e sepse de animais envelhecidos, através da redução da contratilidade de anéis de aorta. Todavia, maior magnitude de efeito foi observada no grupo controle, sugerindo maior modulação do  $O_2^-$  no efeito contrátil desse grupo, quando comparados com o grupo submetido à sepse. Sabe-se que o aumento dos níveis de NO, através da iNOS, observado na sepse, pode gerar competição com a SOD, para reagir com o  $O_2^-$  e gerar ONOO<sup>-</sup> (HUET, 2011).

Altamente reativo, o ONOO<sup>-</sup> contribui diretamente para o relaxamento do músculo liso vascular (LAMB DEN, 2018), além de estar associado à distúrbios no metabolismo celular e apoptose, gerando danos oxidativos em DNA, lipídeos de membrana, proteínas e mitocôndrias (HUET, 2011). Esses achados, nos faz acreditar que outros produtos oxidantes, além do O<sub>2</sub><sup>-</sup>, estão envolvidos no desequilíbrio oxidativo dos nossos animais envelhecidos submetidos a sepse moderada, contribuindo assim, para maior disfunção vascular e pior desfecho clínico.

A atividade do SRAA também é demonstrada tanto no envelhecimento quanto na sepse (VAN THIEL; 2002; LUND, 2007; DOERSCHUG, 2010; MEDERLE, 2013; COSTA, 2016; NEVES, 2018; FERNANDES, 2021). A angiotensina II (ANG II) demonstrou ter impacto no sistema cardiovascular durante o envelhecimento, através de alterações na estrutura vascular, modificações hemodinâmicas e crescimento celular (GONZALEZ-BOSC, 2001; FERDER, 2002). A sinalização de ANG II promove vasoconstrição, produção de EROS e inflamação (HUNYADY, 2006; BENIGNI, 2010), contribuindo assim, para disfunção endotelial (LUND, 2007). O tratamento crônico, com bloqueadores da via do SRAA, como o losartan, melhoraram a função endotelial em anéis de aorta de animais envelhecidos (GONZALEZ-BOSC, 2001; COSTA, 2016). Na sepse, mediadores do SRAA aumentados, como a ANG II, se correlacionam com a desregulação microvascular e falência de órgãos (DOERSCHUG, 2010; NEVES, 2018). Apesar da concentração marcadamente elevada e de sua função vasoconstritora, a ANG II apresentam seus receptores dessensibilizados durante a sepse (HILGENFELDT, 1987; OHTANI, 1989; MEDERLE, 2013). Além disso, a presença excessiva de substâncias vasodilatadoras, como óxido nítrico e prostanóides, pode causar vasodilatação máxima e atenuar os efeitos vasoconstritores da ANG II (OCHOA, 1991, MEDERLE, 2013). Embora a ativação de SRAA seja uma reação fisiológica contrariando a insuficiência circulatória associada à sepse, sua ativação excessiva pode piorar ainda mais os desfechos clínicos (FORRESTER, 2018; SALGADO, 2009).

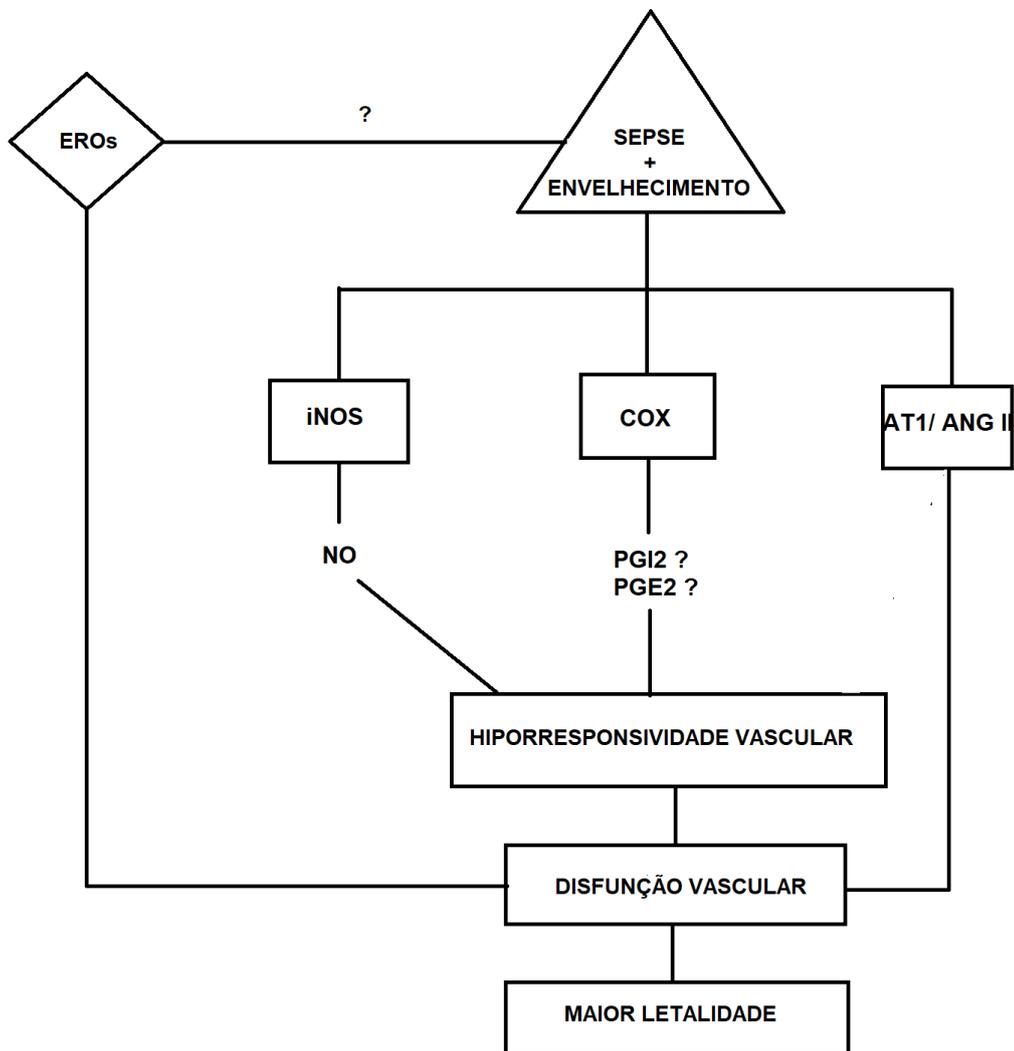
Demonstramos nesse estudo, que a incubação aguda e *in vitro* com losartan, não foi capaz de alterar a resposta contrátil à fenilefrina na condição controle de animais envelhecidos, entretanto, houve, acentuação do efeito anti-contrátil observado nos animais envelhecidos submetidos a sepse., Estudos prévios, através de modelos experimentais de tratamento crônico com bloqueadores do SRAA,

observaram melhorias na função vascular de animais envelhecidos (GONZALEZ-BOSC, 2001; COSTA, 2016), acreditamos que a incubação aguda em anéis isolados de aorta na condição controle, como realizado em nosso estudo, não foi suficiente para mimetizar dados já descritos na literatura. Os nossos achados observados nos animais envelhecidos submetidos a sepse, reforçam a ativação do SRAA, descritos na sepse (DOERSCHUG, 2010; NEVES, 2018). Recente estudo de Fernandes, 2021, demonstrou que o uso de losartan em doses elevadas, reduz a resposta vascular à fenilefrina de animais submetidos a sepse, enquanto que o bloqueio parcial tem o efeito oposto. Acreditamos que, mesmo na presença de receptores dessensibilizados, como é descrito na literatura (FERDER, 2002; MERDELE, 2013), contribuindo para hiporresponsividade vasoconstritora, a presença de mediadores do SRAA, contribuem para disfunção vascular e pior prognóstico (DOERSCHUG, 2010; NEVES, 2018, FERNANDES, 2021), visto também em nossos animais sépticos.

Contudo, diante estudos contraditórios acerca dos efeitos do bloqueio do SRAA na sepse (DIAL, 2014; SUBERVIOLA, 2017; FERNANDES, 2021) mais estudos devem ser realizados para maior compreensão dos mecanismos envolvidos com o pior prognóstico da sepse.

Sabemos que o presente estudo tem uma série de limitações. Realizamos por um lado, inicialmente uma comparação entre camundongos jovens e envelhecidos submetidos a sepse e observamos que a reatividade vascular desses grupos respondem de maneiras diferentes. A exacerbação da disfunção vascular em animais envelhecidos com sepse e a determinação de vias potencialmente envolvidas, através de testagens com bloqueadores farmacológicos, demonstram dados promissores, mas admitimos que apenas sugerem e não comprovam a causalidade. Apesar de nossa atual limitação em continuar os experimentos laboratoriais, por perda de grande número de amostras em detrimento da pandemia da COVID-19, um estudo futuro para estratificar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos com a disfunção vascular consiste em realizar bloqueios farmacológicos mais específicos dentro das vias estudadas nesse trabalho além de analisar expressão ou atividade proteica. Outro estudo futuro consiste na intervenção terapêutica como método de comprovação de eficácia do mecanismo farmacológico de escolha. E finalmente a comparação dos resultados em camundongos machos e fêmeas para analisar e estender as descobertas aqui identificadas.

## 6 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS



## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez, que a sepse moderada por inoculação estafilocócica, promove hiporresponsividade vascular à agentes vasoconstritores exclusivamente em animais envelhecidos submetidos a sepse por mecanismos que envolve a produção de NO mediada pela enzima iNOS e prostanoídes vasodilatadores da via COX. Agregado a esses achados, acreditamos que a presença de EROS, bem como produtos de suas reações e mediadores do SRAA, também contribuem para falência vascular e pior desfecho clínico observado em nossos animais submetidos a sepse.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angus CD, M.P.H., Tom van der Poll. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 2013; 369:840-51.

Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. Ciclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation* 2005; 112: 759-770.

Araújo, C.V.; Estado, V.; Tibiriça, E.; Bozza, P. T.; Castro-Faria-Neto, H. C.; Silva, A.R. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvascular Research*. 2012;84:218-21.

Aronoff, D. M. Cyclooxygenase Inhibition in Sepsis: Is There Life after Death? *Mediators of Inflammation* 2012, 1–7.

Arons MM, Wheeler AP, Bernard GR, et al. Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. *Critical Care Medicine*. 1999;27:699–707.

Asano, S., Manne, N. D. P. K., Nandyala, G., Ma, B., Selvaraj, V., Arvapalli, R.,R. Blough, E. Cecal inoculum peritonitis: An alternative model for sepsis vascular dysfunction study. *Life Sciences* 2015, 141:108–118.

Awata, W. M. C.; Gonzaga, N. A.; Borges, V. F.; Silva, C. B. P.; Tanus-Santos, J. E.; Cunha, F. Q.; Tirapelli, C. R. Perivascular adipose tissue contributes to lethal sepsis-induced vasoplegia in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2019; 17: 172706.

Badea, I. M. et al. The role of interleukin-6 as an early predictor of sepsis in a murine sepsis model. *Rom J Morphol Embryol*. 2019; 60:69-75.

Baldwin Jr. AS. The transcription factor nf- $\kappa$ B and human 22. *Disease. J Clin Invest*. 2001; 107:3-6.

Batista, Priscila Rossi de. Upregulation do receptor tipo Toll 4 pela angiotensina II contribui para a hipertensão arterial e disfunção vascular através da produção de espécies reativas de oxigênio. 2014. 220 f. Tese (Doutorado em Ciências

Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

Batista, R. S.;Gomes, A.P.; Lima, L.C.; Vitorino, R.R.;Perez, M.C.A.;Mendonça, E.G.; Oliveira, M.G.A.; Geller, M. Sepsis: atualidades e perspectivas. *Rev. bras. ter. intensiva* 2011; 23: 207-216.

Benigni, A.;Cassis, P.; Remuzzi, G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging, *EMBO. Mol. Med.* 2010 2: 247-257.

Bermejo-Martin, J.F.; Martín-Fernandez, M.; López-Mestanza C.; Duque, P.; Almansa, R. Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease). *J Clin Med.* 2018, 400: 2-15.

Bernard G. R.; Wheeler A. P.; Russell J.A.; Schein R.; Summer W. R.; Steinberg K. P.; Fulkerson W.J.; Wright P. E.; Christman B. W.; Dupont W.D.; et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with Sepsis. *N Engl J Med.* 1997; 336:912–918.

Bernard, G. R.; Reines, H.D.; Halushka, P. V. et al. Prostacyclin and thromboxane A2 formation increased in human sepsis syndrome. Effects of cyclooxygenase inhibition. *Am Rev Respir Dis.* 1991; 144:1905-1101.

Blacher J. & Safar M.E . Large-artery stiffness, hypertension and cardiovascular risk in older patients. *Nat Clin Prac Cardiovasc Med* 2005, 2: 450–455.

Boldt J. Papsdorf M.; Kumle B. et al. Influence of angiotensin-converting enzyme inhibitor enalaprilat on endothelial-derived substances in the critically ill. *Crit Care Med* 1998; 26:1663-70

Bone R. C.; Jacobs E. R.; Wilson F. J. Jr. Increased hemodynamic and survival with endotoxin and septic shock with ibuprofen treatment. *Progress in Clinical and Biological Research* 1987;236:327–332.

Bos C. L.; Richel D.J.; Ritsema, T.; Peppelenbosch M.P.; Versteeg H.H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *International Journal of Biochemistry*. 2004; 36: 1187-1205.

Brandes R.P.; Fleming I.; Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc. Res.* 2005. 66:286–294.

Brogliato, A. R.; Antunes, C. A.; Carvalho, R. S.; Monteiro, A. P. T.; Tinoco, R. F.; Bozza, M. T.; Benjamim, C. F. (2012). Ketoprofen Impairs Immunosuppression Induced by Severe Sepsis and Reveals an Important Role for Prostaglandin E2. *Shock*. 2012, 38: 620–629.

Bucher M.; Ittner K.P.; Hobbhahn J. et al. Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. *Hypertension*. 2001;38:177-82.

Camicia G.; Pozner R.; De Larrañaga G.; Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*. 2014;42:286–294.

Castoldi A; Braga, T.T.; Correa-Costa, M. TLR 2, TLR 4 and MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. *Plos One*. 2012; 7:5:-37584.

Cheng, Z.; Abrams, S. T.; Toh, J.; Wang, S. S.; Wang, Z.; Yu, Q.; Wang, G. The Critical Roles and Mechanisms of Immune Cell Death in Sepsis. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11:1918.

Choudhury, S.; Kannan, K.; Pule Addison, M.; Darzi, S. A.; Singh, V.; Singh, T. U.; Mishra, S. K. Combined treatment with atorvastatin and imipenem improves survival and vascular functions in mouse model of sepsis. *Vascular Pharmacology* 2015, 71: 139–150.

Clifford K.; Dy-Boarman E.; Haase K.; Maxvill K.; Pass E.; Alvarez C. Challenges with Diagnosing and Managing Sepsis in Older Adults. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016 ; 14:231-41.

Colbert, J.F.; Schmidt, E.P. Endothelial and microcirculatory function and dysfunction in sepsis. *Clin. Chest Med.* 2016, 37: 263–275.

Coletta C.; Módis K.; Oláh G.; Brunyánszki A.; Herzig D.S.; Sherwood E.R.; Ungvári Z. Szabo C. Endothelial dysfunction is a potential contributor to multiple organ failure and mortality in aged mice subjected to septic shock: preclinical studies in a murine model of cecal ligation and puncture. *Crit Care.* 2014; 18: 511-20.

Cooper L.T.; Cooke J.P.; Dzau V.J. The vasculopathy of aging. *J Gerontol.* 1994 ;49: 191-6.

Costa, G.; Garabito, M.; Jiménez-Altayó, F.; Onetti, Y.; Sabate, M.; Vila, E., Dantas, A. P. Sex differences in angiotensin II responses contribute to a differential regulation of cox-mediated vascular dysfunction during aging. *Experimental Gerontology.* 2016 85: 71–80.

Csiszar, A.; Ungvari, Z.; Koller, A.; Edwards, J. G.; Kaley, G. Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries. *FASEB J* .2003; 17:1183-1185.

Culp J. R.; Erdős E. G.; Hinshaw I. B.; Holmes D. D. Effects of anti-inflammatory drugs in shock caused by injection of living E. coli cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1971;137:219–223.

Dawson S. J.; Tsui D. W.; Murtaza M.; Biggs H.; Rueda O. M.; Chin S. F.; Dunning M. J.; Gale D.; Forshew T.; Mahler-Araujo B.; Rajan S.; Humphray S.; Becq J.; Halsall D.; Wallis M.; Bentley D.; Caldas C.; Rosenfeld N. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013 368:1199-1209.

De Souza, P.; Guarido, K. L.; Scheschowitsch, K.; Da Silva, L. M.; Werner, M. F.; Assreuy, J.; Da Silva-Santos, J. E. Impaired vascular function in sepsis-surviving rats mediated by oxidative stress and Rho-Kinase pathway. *Redox Biology.* 2016; 10: 140–147.

Dial, S.; Nessim, S.J.; Kezouh, A.; Benisty, J.; Suissa, S. Antihypertensive agents acting on the renin-angiotensin system and the risk of sepsis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2014; 78: 1151–1158.

Doerschug, K. C.; Delsing, A. S.; Schmidt, G. A.; Ashare, A. Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis. *Critical Care.* 2010; 14: 24-32.

Dorris S. L.; Peebles R. S. PGI<sub>2</sub> as a regulator of inflammatory diseases. *Mediat Inflamm.* 2012 ;2012: 1-9.

Du Cheyron D.; Lesage A.; Daubin C. et al. Hyperreninemic hypoaldosteronism: a possible etiological factor of septic shock-induced acute renal failure. *Intensive Care Med.* 2003; 29:1703-9.

Duffy M. J.; Mullan B. A.; Craig T. R.; Shyamsundar M.; Mac Sweeney R. E.; Thompson G.; Stevenson M.; McAuley D. F. Impaired endothelium-dependent vasodilatation is a novel predictor of mortality in intensive care. *Crit Care Med.* 2011; 39:629–635.

El Assar, M.; Angulo, J.; Rodríguez-Mañas, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radical Biology and Medicine.* 2013 65: 380–401.

Endo H.; Akahoshi T.; Kashiwazaki S. Additive effects of IL-1 and TNF on induction of prostacyclin synthesis in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;156:1007–1014.

Evans T. Diagnosis and management of sepsis. *Clin Med (Lond).* 2018;18:146-149.

Ferder, L. Advances in our understanding of aging: role of the renin–angiotensin system. *Current Opinion in Pharmacology,*2002; 2: 189–194.

Fernandes, D. et al. Angiotensin II receptor type 1 blockade improves hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock. *European Journal of Pharmacology.* 2021; 897:173953.

Fernandes, D., & Assreuy, J. (2008). Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock*. 2008; 30: 10–13.

Fischer, L. G.; Horstman, M. S.; Hahnenkamp, K.; Jechner, N. E.; Rich, G. F. Selective iNOS inhibition attenuates acetylcholine- and bradykinin-induced vasoconstriction in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. *Anesthesiology*. 1999 91: 1724.

Forni M.; Mazzola S.; Ribeiro L.A.; Pirrone F.; Zannoni A.; Bernardini C.; Bacci M. L.; Albertini M. Expression of endothelin-1 system in a pig model of endotoxic shock. *Regul Pept*. 2005;131:89–96.

Forrester, S.J.; Booz, G.W.; Sigmund, C.D.; Coffman, T.M.; Kawai, T.; Rizzo, V.; Scalia, R.; Eguchi, S. Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Phys. Rev*. 2018; 98: 1627–1738.

Forstermann, U.; Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 2012; 33: 829–37.

Francia, P.; Delli Gatti, C.; Bachschmid, M.; Martin-Padura, I.; Savoia, C.; Migliaccio, E.; Pelicci, P. G.; Schiavoni, M.; Luscher, T. F.; Volpe, M.; Cosentino, F. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; 110:2889-2895.

Freise, H.; Bruckner, U. B.; Spiegel, H. U. Animal models of sepsis. *J Invest Surg*. 2001; 14:195-212.

Garrone P.; Galibert L.; Rousset F.; Fu S. M.; Banchereau J. Regulatory effects of prostaglandin E2 on the growth and differentiation of human B lymphocytes activated through their CD40 antigen. *J Immunol*. 1994; 152:4282-4290.

Genga, K.R.; Russell, J.A. Update of Sepsis in the Intensive Care Unit. *J Innate Immun*. 2017;9:441-455.

Gerhard, M.; Roddy, M. A.; Creager, S. J.; Creager, M. A. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension* 1996; 27:849-53.

Girard, T. D.; Opal, S. M.; Ely, E. W. Insights into severe sepsis in older patients: from epidemiology to evidence-based management. *Clin Infect Dis.* 2005;40:719–27.

Goldmann, O.; Hertzén, E.; Hecht, A. et al. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin E<sub>2</sub> modulates the severity of infection caused by *Streptococcus pyogenes*. *The Journal of Immunology.* 2010;185:2372–2381.

Goldshtein, H.; Hausmann, M. J.; Douvdevani, A. A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Annals of Clinical Biochemistry.* 2009; 46: 488–494.

Gonzalez-Bosc, L. V.; Kurnjek, M. L.; Muller, A.; Terragno, N. A.; Basso, N. Effect of chronic angiotensin II inhibition on the nitric oxide synthase in the normal rat during aging. *J Hypertens* 2001, 19:1403-1409.

Gotts, J.; Matthay, M.A. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ.* 2016; 23:353-1585.

Gray, G. A.; Schoot, C.; Julou-Schaeffer, G.; Fleming, I.; Parratt, J. R.; Stoclet, J. C. The effect of inhibitors of the L-arginine/nitric oxide pathway on endotoxin-induced loss of vascular responsiveness in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 1991;103:1218-1224.

Green, D.R.; Galluzzi, L.; Kroemer, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 2011. 333:1109–1112.

Haidara, M. A.; Morsy, M. D.; Abdel-Razek, H. A.; Mikhailidis, D. P.; Isenovic, E. R. Effects of L-Canavanine and ozone on vascular reactivity in septicemic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2010; 66: 255–264.

Hamilton, C. A.; Brosnan, M. J.; McIntyre, M.; Graham, D.; Dominiczak, A. F.

Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 37:529-534.

Haupt, M. T.; Jastremski, M. S.; Clemmer, T. P.; Metz, C. A.; Goris, G. B. Effect of ibuprofen in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, multicenter study. *Critical Care Medicine*. 1991;19:1339–1347.

Hein, O. V.; Misterek, K.; Tessmann, J. P.; Van Dossow, V.; Krimphove.; M, Spies C. Time course of endothelial damage in septic shock: prediction of outcome. *Crit Care*. 2005;9:323–330.

Heineman, J. M.; Hamrick-King, J.; Sewell, B. S. Review of the aging of physiological systems. *Gerontological Nursing Competencies for Care*. 2010 2010; 2:129-216.

Henkin, C. S.; Coelho, J. C.; Paganella, M. C.; De Siqueira, R. M.; Dias, F. S. Sepsis: uma visão atual. *Scientia Medica* 2009; 3: 135-145.

Hevel, J. M.; White, K. A.; Marletta, M. A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 1991; 266: 22789-91.

Higuchi, S.; Ohtsu, H.; Suzuki, H. et al. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci* 2007;112:417-28.

Hilgenfeldt, U.; Kienapfel, G.; Kellermann, W.; Schott, R.; Schmidt, M. Renin-angiotensin system in sepsis. *Clin Exp Hypertens*. 1987;17:1493–1504.

Homma, S.; Hirose, N.; Ishida, H.; Ishii, T.; Araki, G. Carotid plaque and intima-media thickness assessed by b-mode ultrasonography in subjects ranging from young adults to centenarians. *Stroke* 2001; 32: 830–835.

Huet, O. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Frontiers in Bioscience*. 2011; 16: 1986.

Hunyady, L.; Catt, K. J. Pleiotropic at1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin ii. *Mol. Endocrinol* 2006; 20: 953-970.

Ince, C.; Mayeux, P. R.; Nguyen, T.; Gomez, H.; Kellum, J. A.; Ospina-Tascón, G. A.; Hernandez, G.; Murray, P.; Backer, D. The endothelium in sepsis. *Shock*. 2016;45:259-70.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE: IMPLEMENTAÇÃO DE PROTOCOLO GERENCIADO DE SEPSE PROTOCOLO CLÍNICO Atendimento ao paciente adulto com sepse / choque séptico. Revisado em Agosto/18.

Joffre, J.; Hellman J.; Ince, C.; Ait-Oufella H. Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;202:361-370.

Johansson, P. I.; Nakahira, K., Rogers, A. J.; McGeachie, M. J.; Baron, R. M.; Fredenburgh, L. E.; Christopher, K. B. Plasma mitochondrial DNA and metabolomic alterations in severe critical illness. *Critical Care* 2018; 22:2275-7.

Julou-Schaeffer, G.; Gray, G. A.; Fleming, I.; Schott, C.; Parratt, J. R.; Stoclet, J. C. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol* 1990 259:1038-1043.

Konukoglu, D.; Uzun, H. Endothelial dysfunction and hypertension. 2017; 956:511–540.

Lakatta, E. G.; Levy, D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*. 2003 ;107:139-46.

Lambden, S.; Creagh-Brown, B. C.; Hunt, J.; Summers, C.; Forni, L. G. Definitions and pathophysiology of vasoplegic shock. *Critical Care* 2018; 22:174.

Lekawanvijit, S.; Kompa, A. R.; Manabe, M.; Wang, B. H.; Langham, R. G.; Nishijima,

F.; Kelly, D. J.; Krum, H. Chronic kidney disease-induced cardiac fibrosis is ameliorated by reducing circulating levels of a non-dialysable uremic toxin, indoxyl sulfate. *PLoS One*. 2012;7:41281.

Lewis, A. J.; Billiar, T. R.; Rosengart, M.; R. Biology and Metabolism of Sepsis: Innate Immunity, Bioenergetics, and Autophagy. *Surg Infect (Larchmt)*. 2016;17:286-93.

Liao , W; Zuo, X.; Lin, G.;Zhou, Y.;Fu, Y.;Cai, S.;Wei, P.P.;Liu, Y.X.;Liu, Y.;Ma, G.;Bei, J.X. Microbial cell-free DNA in plasma of patients with sepsis: a potential diagnostic methodology. *Discov Med* 2020;29:129-137.

Liaudet, L.; Rosenblatt-Velin, N.;Pacher, P. Role of peroxynitrite in the cardiovascular dysfunction of septic shock. *Curr. Vasc. Pharmacol* 2013; 11: 196–207.

Lo, Y. M.; Rainer, T. H.; Chan, L.Y.; Hjelm, N. M.; Cocks, R. A. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem* 2000; 46:319-323.

Lopez, R.M.;Lopez J.E.; López, J.S.et al. Effects of indomethacin on prostanoid synthesis and vasomotor responsiveness in endothelium-denuded abdominal and thoracic aorts of wistar rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2017, , 39:3, 210-219.

Lund, D. D.; Brooks, R. M.; Faraci, F. M.; Heistad, D. D. Role of angiotensin II in endothelial dysfunction induced by lipopolysaccharide in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007; 293:3726–H3731.

Luou, E.; Wenhong, X.; Liu, W.; Bin, R.; ZHOU, Yingbi. The endothelial cyclooxygenase pathway: Insights from mouse arteries. *European Journal of Pharmacology*, v. 780, p. 148–158, 2016.

Mack, V. E.; Mackrell, P. J.; Concannon, E. M. et al. Blocking prostaglandin E<sub>2</sub> after trauma attenuates pro-inflammatory cytokines and improves survival. *Shock*. 2000;14:374–379.

Mantzaris, K.; Tsolaki, V.; Zakynthinos, E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:5985209.

Marmol, F.; Sanchez, J.; Lopez, D.; Martinez, N.; Rosello-Catafau, J.; Mitjavila, M. T.; Puig-Parellada, P. Loss of adaptation to oxidative stress as a mechanism for aortic damage in aging rats. *J Physiol Biochem* 2007; 63:239-247.

Martin, G.S.; Mannino, D. M.; Moss, M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34:15–21.

Maruchi, Y.; Tsuda, M.; Mori, H.; Takenaka, N.; Gocho, T.; Huq, M. A.; Takeyama, N. (2018). Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Critical Care* 2018; 22:1-7.

Mastino A, Piacentini M, Grelli S, Favalli C, Autuori F, Tentori L, Oliverio S, Garaci E: Induction of apoptosis in thymocytes by prostaglandin E2 in vivo. *Dev Immunol* 2(4):263Y271, 1992.

Mayr, F. B.; Yende, S.; Angus, D.C. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 2013; 5:4–11.

Mederle, K.; Schweda, F.; Kattler, V.; Doblinger, E.; Miyata, K.; Höcherl, K.; Castrop, H. The angiotensin II AT1 receptor-associated protein Arap1 is involved in sepsis-induced hypotension. *Critical Care* 2013; 17:4-130.

Memiş, D.; Karamanlioglu, B.; Turan, A.; Koyuncu, O.; Pamukçu, Z. Effects of lornoxicam on the physiology of severe sepsis. *Critical Care*. 2004;8:474–482.

Metz, C. A.; Sheagren, J. N. "Ibuprofen in animal models of septic shock. *Journal of Critical Care* 1990; 5: 206– 212.

Michel, T.; Vanhoutte, P.M. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch*.

2010; 450(6): 807-16

Michelini, L.C.; Rossoni, L.V. Vasomotricidade e Regulação local de fluxo. In: AIRES, M.M. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.cap. 32, p.497- 513.

Mishra, S. K.; & Choudhury, S. Experimental Protocol for Cecal Ligation and Puncture Model of Polymicrobial Sepsis and Assessment of Vascular Functions in Mice. *Traumatic and Ischemic Injury* 2018; 161–187.

Mitchell, G.F.; Parise, H.; Benjamin, E. J. et al . Alterações na rigidez arterial e reflexão das ondas com o avanço da idade em homens e mulheres saudáveis: o Framingham Heart Study . *Hipertensão* 2004 ; 43 : 1239 – 45.

Mongensen, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Cli. Microbiol. Ver.* 2009;22:240-273.

Mulvany, M. J.; Halpern, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation research.* 1977;41:19–26, 1977.

Narumiya, S.; Sugimoto, Y.; Ushikubi, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999;79:1193–1226.

Nasa, P.; Juneja, D.; Singh, O. Severe sepsis and septic shock in the elderly: An overview. *World J Crit Care Med.* 2012; 4: 23–30.

Neiryck, N.; Glorieux, G.; Boelaert, J.; Schepers, E.; Liabeuf, S.; Dhondt, A.; Massy, Z.; Vanholder, R. Uremia-related oxidative stress in leukocytes is not triggered by  $\beta$ 2-microglobulin. *J Ren Nutr.* 2013 ;23:456-63.

Németh, K.; Leelahavanichkul, A.; Yuen, P. S. T.; Mayer, B.; Parmelee, A.; Doi, K.; Mezey, É. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine* 2008;15: 42–49.

Neves, M. F.; Cunha, A. R.; Cunha, M. R.; Gismondi, R. A.; Oigman, W. The Role of Renin–Angiotensin–Aldosterone System and Its New Components in Arterial Stiffness and Vascular Aging. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention* 2018; 25: 137–145.

Newton, C.R.; Curran, B.; Victorino, G.P. Angiotensin II type 1 receptor activation increases microvascular permeability via a calcium dependent process. *J Surg Res* 2005;123:33-9.

Nin, N.; El-Assar, M.; Sánchez, C.; Ferruelo, A.; Sánchez-Ferrer, A.; Martínez-Caro, L.; Lorente, J. A. Vascular Dysfunction in Sepsis. *Shock* 2001; 36: 156–161.

Ochoa , J. B.; Udekwu, A. O.; Billiar, T.R.; Curran, R.D.; Cerra, F.B.; Simmons R. L.; Peitzman, A. B. Níveis de óxido de nitrogênio em pacientes após trauma e durante sepse. *Ann Surg.* 1991; 17 : 621–626.

Ohtani, R; Ohashi, Y.; Muranaga, K.; Itoh, N.; Okamoto, H. Changes in activity of the renin-angiotensin system of the rat by induction of acute inflammation. *Life Sci.* 1989;17:237–241.

Oliveira, T. H. C. et al. Sepsis induced by *Staphylococcus aureus*: participation of biomarkers in a murine model. *Med. Sci. Monit.* 2015; 21:345-55.

Palmer, R. M. J. The discovery of nitric oxide in the vessel wall: A unifying concept in the pathogenesis of sepsis. *Arch. Surg.* 1993; 128: 396.

Paravicini, T. M.; Touyz, R.M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. *Diabetes Care* 2008; 31(2).

Parkington, H. C.; Coleman, H. A.; Tare, M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res.* 2004;49:509–514.

Patrono, C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and

clinical perspective. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2016;82: 957–964.

Perner, A. et al. Sepsis: frontiers in diagnosis, resuscitation and antibiotic therapy. *Intensive Care Med.* 2016;42:1958-1969.

Price, S. A.; Spain, D. A.; Wilson, M. A.; Harris, P. D.; Garrison, R. N. Subacute Sepsis Impairs Vascular Smooth Muscle Contractile Machinery and Alters Vasoconstrictor and Dilator Mechanisms. *Journal of Surgical Research.* 1999; 83: 75–80.

Rainer, T. H.; Wong, L. K.; Lam, W.; Yuen, E.; Lam, N.Y.; Metreweli, C.; Lo, Y. M. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 2003 ;49:562-569.

Rajendran, P.; Rengarajan, T.; Thangavel, J.; Nishigaki, Y.; Sakthisekaran, D.; Sethi, G.; Nishigaki, I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9:1057-69.

Ramos, K. S. Vascular toxicology: a cellular and molecular perspective. In: *Cardiovascular Toxicology* 1992; 2: 483- 516.

Reid, V. L.; Webster, N. R. Role of microparticles in sepsis. *Brit J Anaest.* 2012;109:503–513.

Riedo, F. X.; Munford, R.S.; Campbell, W. B.; Reisch, J. S.; Chien, K. R.; Gerard, R. D. Deacylated lipopolysaccharide inhibits plasminogen activator inhibitor-1, prostacyclin, and prostaglandin E2 induction by lipopolysaccharide but not by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1990;144:3506–3512.

Rodriguez-Mañas, L.; El-Assar, M.; Vallejo, S.; Lopez-Doriga, P.; Solis, Rubio-Gayosso, I.; Platts, S.H.; Duling, B. R. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:2247–2256.

Ruggeri, P.; Nicocia, G.; Venza, I.; Venza, M.; Valenti, A.; Teti, D. Polyamine metabolism in prostaglandin E<sub>2</sub> treated human T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2000; 22:117-129.

Russel, J. A. management of sepsis. *N.Engl J med.* 2006; 355:1699-713.

Saito, H.; Papaconstantinou, J. Age-associated differences in cardiovascular inflammatory gene induction during endotoxic stress. *J Biol Chem.* 2001; 276:29307–29312.

Salgado, D. R.; Rocco, J. R., Silva, E.; Vincent, J.-L. Modulation of the renin–angiotensin–aldosterone system in sepsis: a new therapeutic approach? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2009 14:11–20.

Sandgren, T.; Sonesson, B.; Ahlgren, R.; Lanne, T. Factors predicting the diameter of the popliteal artery in healthy humans. *J Vasc Surg* 1998; 28: 284–289.

Sandgren, T.; Sonesson, B.; Ahlgren, R.; Lanne, T. The diameter of the common femoral artery in healthy human: influence of sex, age, and body size. *J Vasc Surg* 1999, 503–510.

Scheschowitsch, K.; Moraes, J. A.; Sordi, R.; Barja-Fidalgo, C.; Assreuy, J. . Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Research* 2015 100, 73–84.

Schrier, R. W.; Wang, W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 2004;351:159-69.

Schwartz, J. B.; Zipes, D. P. Cardiovascular Disease in the Elderly. 9th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2011.

Serezani, C. H.; Chung, J.; Ballinger, M. N.; Moore, B. B.; Aronoff, D. M.; Peters-Golden, M. Prostaglandin E<sub>2</sub> suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by

inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:562-570.

Seymour, C. W.; Liu, V.X.; Iwashyna, T.J.; Brunkhorst, F.M.; Rea, T.D.; Scherag, A.; Rubenfeld, G.; Kahn, J.M.; Shankar-Hari, M.; Singer, M.; Deutschman, C. S.; Escobar, G. J.; Angus, D. C Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, 315(8), 762-774.

Shankar-Hari, M.; Phillips, G. S.; Levy, M.L.; Seymour, C.W.; Liu, V. X.; Deutschman, C. S.; Angus, D. C.; Rubenfeld, G. D.; Singer, M. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:775-87.

Short, B. L.; Gardiner, M.; Walker, R. I.; Jones, S. R.; Fletcher, J.R. Indomethacin improves survival in gram-negative sepsis. *Advances in Shock Research*. 1981;6:27–36.

Sibbald, W. J.; Fox, G.; Martin, C. Abnormalities of Vascular Reactivity in the Sepsis Syndrome. *Chest*, 1991 100: 155–159.

Singer, M.; Deutschman, C. S.; Seymour, C. W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G. R.; Chiche, J. D.; Coopersmith, C. M.; Hotchkiss, R. S.; Levy, M. M.; Marshall, J. C.; Martin, G. S.; Opal, S. M.; Rubenfeld, G. D.; Poll, T.; Vincent, J.L.; Angus, D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:801-10.

Soerensen, K. E.; Olsen, H. G.; Skovgaard, K.; Wiinberg, B.; Nielsen, O. L.; Leifsson, P. S.; Iburg, T. M. Disseminated Intravascular Coagulation in a Novel Porcine Model of Severe Staphylococcus aureus Sepsis Fulfills Human Clinical Criteria. *Journal of Comparative Pathology*. 2013; 149:463–474.

Starr, M. E.; Ueda, J.; Takahashi, H. et al. Age-dependent vulnerability to

endotoxemia is associated with reduction of anticoagulant factors activated protein C and thrombomodulin. *Blood*. 2010; 115:4886–4893.

Stuart, M. J.; Setty, Y.; Walenga, R. W.; Graeber, J. E.; Ganley, C. Effects of hyperoxia and hypoxia on vascular prostacyclin formation in vitro. *Pediatrics*. 1984;74:548–553.

Stuehr, D.J.; Cho, H. J.; Kwon, N. S.; Weise, M. F.; Nathan, C. F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 7773-7.

Suberviola, B.; Rodrigo, E.; Gonzalez-Castro, A.; Serrano, M.; Heras, M.; CastellanosOrtega, A. Association between exposure to angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers prior to septic shock and acute kidney injury. *Med. Int*. 2017; 41: 21–27.

Sun, K.; Jiang, P.; Chan, K. C.; Wong, J.; Cheng, Y. K.; Liang, R. H.; Chan, W. K.; Chan, S. L.; Cheng, S. H.; Chan, R. W.; Tong, Y. K.; Wong, R. S.; Hui, D. S.; Leung, T. N.; Leung, T. Y.; Lai, P. B.; Chiu, R. W.; Lo, Y. M. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:5503-5512.

Terborg, C.; Schummer, W.; Albrecht, M.; Reinhart, K.; Weiller, C.; Röther, J. Dysfunction of vasomotor reactivity in severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Medicine*, 2001; 27: 1231–1234.

Tesauro, M.; Mauriello, A.; Rovella, V.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Cardillo, C.; Melino, G.; Di, N. Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification. *J Intern Med*. 2017 ;281:471-482.

Thijssen, D.; Carter, S.; Green, D. Arterial structure and function in vascular ageing: are you as old as your arteries? *J Physiol*. 2016; 594:2275-84.

Tucsek, Z.; Gautam, T.; Sonntag, W. E.; Toth, P.; Saito, H.; Salomao, R.; Szabo, C.; Csiszar, A.; Ungvari, Z. Aging Exacerbates Microvascular Endothelial

Damage Induced by Circulating Factors Present in the Serum of Septic Patients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013; 68: 652–660.

Umberger, R.; Callen, B.; Brown, M. L. Severe sepsis in older adults. *Crit Care Nurs Q.* 2015;38 :259-70.

Ungvari, Z.; Bailey-Downs, L.; Sosnowska, D.; Gautam, T.; Koncz, P.; Losonczy, G.; Ballabh, P.; de Cabo, R.; Sonntag, W. E.; Csiszar, A. Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301:363-372.

Ungvari, Z.; Tarantini, S.; Kiss, T.; Wren, J.; Giles, C.; Griffin, C.; Murfee, W.; Pacher, P.; Csiszar, A. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15:555-565.

Vallet, B. Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? *Crit Care.* 2003;7:130–138.

Van den Munckhof, I.; Scholten, R.; Cable, N.T.; Hopman, M.T.; Green, D.J.; Thijssen, D. H. Impact of age and sex on carotid and peripheral arterial wall thickness in humans. *Acta Physiol* 2012; 206: 220–228.

Van Thiel, B. S.; Van der Pluijm, I.; Te Riet, L.; Essers, J.; Danser, A. H. J. The renin–angiotensin system and its involvement in vascular disease. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 763, 3–14.

Vane, J. R.; Anggorsd, E. E.; Botting, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England Journal of Medicine* 1990; 323: 27-36.

Vlachopoulos, C.; Aznaouridis, K.; Stefanadis, C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:1318–1327.

Walborn, A.; Rondina, M.; Mosier, M.; Fareed, J.; Hoppensteadt, D. Endothelial

Dysfunction Is Associated with Mortality and Severity of Coagulopathy in Patients with Sepsis and Disseminated Intravascular Coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2019 ; 25 :107-11.

Wang , P.; Zhou,M.;Cioffi,W.G.; Bland,K.I.; Ba,Z.F.;Chaudry, I.H. Is prostacyclin responsible for producing the hyperdynamic response during early sepsis? *Crit Care Med.* 2000 ;28:1534-9.

Wang, M.; Monticone, R.E.; Lakatta, E. G. Arterial aging: a journey into subclinical arterial. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19:201-7.

Weinbaum, S.; Tarbell, J. M.; Damiano, E. R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007;9:121–167.

Wright, D. H.; Abran, D.; Bhattacharya, M.; Hou, X.; Bernier, S. G.; Bouayad, A.; Fouron, J. C.; Vázquez-Tello, A.; Beauchamp, M. H.; Clyman, R. I.; Peri, K.; Varma, D. R.; Chemtob, S. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: 1343-1360.

Xin, Y.; Gao, X.; Wang, W.; Xu, X.; Yu, L.; Ju, X.; Li, A. Circulating cell-free DNA indicates M1/M2 responses during septic peritonitis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2016; 477: 589–594.

Xu, X.; Wang, B.; Ren, C.; Hu, J.; Greenberg, D. A.; Chen, T.; Jin, K. Recent Progress in Vascular Aging: Mechanisms and Its Role in Age-related Diseases. *Aging and Disease*,2017; 8:486-91.

Yamamoto, K.; Shimokawa, T.; Yi, H. et al. Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis: increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and lipopolysaccharide signaling with aging. *Am J Pathol.* 2002; 161:1805–1814

Yi. C.; Cao, Y.; Mao S.H. et al. Recombinant human growth hormone improves survival and protects against acute lung injury in murine *Staphylococcus aureus* sepsis. *Inflamm Res.* 2009;58:855–62.

Yuyun, M. F.; Leong, L. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5- methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? *Microvascular research*, 2018;119: 7–12.

Zeerleder, S.; Zwart, B.; Willemin, W. A.; Aarden, L. A.; Groeneveld, A. B.; Caliezi, C.; Van Nieuwenhuijze, A. E.; Van Mierlo, G. J, Eerenberg, A. J.; Lammle ,B.; Hack, C. E. Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31:1947-1951.

Zhou, M.; Wang, P.; Chaudry, I. H. Endothelial nitric oxide sythase is downregulated during hyperdynamic sepsis. *Biochim. Biophys. Acta* 1997 ;1335:182.

Zuurbier, C.; Vink, H.; Koeman, A.; Demirci, C.; Ince, C. Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and decreases lineal density of capillaries with flowing RBC's. *J Appl Physiol*. 2005;99:1471–1476.

## **9 SUBPROJETOS**

Os anexos I, II, III e IV foram outros projetos que participei durante meu doutorado.

O artigo do ANEXO I é um subprojecto do projeto principal do meu doutoramento que já foi publicado. Os artigos do ANEXO II, III e IV são colaborações que fiz neste período na temática de DNA livre circulante no contexto da sepse, molécula que também avaliei no meu projeto, e que faz parte das linhas de pesquisa de minha orientadora.

## 10 ANEXO I

### 10.1 O POTENCIAL DA ESPECTROSCOPIA FT-IR PARA MELHORAR OS CUIDADOS DE SAÚDE NA SEPSE

O diagnóstico precoce de doenças e o manejo das condições agudas são vitais para melhorar as chances de sobrevivência. A sepse é uma delas, responsável aproximadamente por 5 milhões de óbitos anualmente (FLEISCHMANN, 2016). A síndrome séptica tem diferentes graus de gravidade, que se dividem em infecção, sepse e choque séptico, tendo o diagnóstico correto e precoce como ponto chave para eficácia no tratamento e recuperação do paciente (SINGER, 2016). Atualmente, o diagnóstico precoce é realizado pela avaliação das alterações do estado clínico, mental, funcional, dos sinais vitais e por meio de escores clínicos, como o SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) e qSOFA (quick SOFA) (FLEISCHMANN, 2016). No entanto, a busca por um marcador bioquímico, ou qualquer ferramenta diagnóstica, que possa ser usada para confirmar prontamente a infecção e o início da sepse tem sido fonte de intensas pesquisas (PIERRAKOS, 2010).

A busca por melhores técnicas de diagnóstico clínico, que permita monitoramento dos pacientes, com técnicas rápidas de menor invasão e de baixo custo, é sem dúvida, um dos principais desafios para melhorar o conforto, viabilidade e diagnóstico do paciente. Uma gama de abordagens espectroscópicas para análise e diagnóstico da sepse foi recentemente explorada. Espectroscopias de absorção Raman e infravermelho têm, em geral, atraído muita atenção nas últimas décadas para aplicações biomédicas (ELUMALAI, 2014; ELUMALAI, 2017; ROY, 2020) e, particularmente, mais recentemente para análise de biofluidos, incluindo saliva, bile, leite materno, suco pancreático, lágrimas, sangue, urina (ESSENDUBI, 2007; RODRIGUES, 2021; BONNIER, 2014; BAKER, 2016; YUNANTO, 2019).

A espectroscopia de absorção infravermelha com transformada de Fourier (FTIR) tem sido empregada para detecção precoce da sepse neonatal (YUNANTO, 2019) e análise dos órgãos e soro de camundongos submetidos à sepse (GAUTAM, 2016; BATTY, 2019). Ademais, a análise de amostras em FTIR, forneceu informações valiosas sobre os desequilíbrios bioquímicos associados à sepse, incluindo alterações na proporção de carboidratos, lipídeos e proteínas além do

aumento do DNA, em soro de camundongos sépticos (SUHARTONO, 2018).

Neste contexto, desenvolvemos em colaboração, um projeto piloto para identificar amostras de plasma animal em estado de sepse ou não, através da técnica de FTIR, que permite análises quanto a mudanças de perfil bioquímico em biofluidos. Para isso utilizamos um modelo de peritonite infecciosa causada pela inoculação de *Staphylococcus aureus* em cavidade peritoneal. Este modelo foi capaz de induzir sepse em camundongos com 3 meses de idade da espécie Balb-c, após 24 horas de sua indução. A técnica experimental foi realizada por meio de amostras triplicatas de plasma, que foram processadas no espectômetro. Para análise estatística, análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante linear (LDA) foram aplicadas.

Nossos achados da análise espectroscópica através do FTIR em plasma de camundongos sépticos, indicam que há alteração marcante nos compostos de ácidos graxos e lipídeos quando comparados aos grupo controle, com possibilidade de diferenciar claramente um padrão amostral entre os grupos estudados. Este é um primeiro passo para o avanço dos estudos em áreas de diagnóstico e tratamento da sepse que ainda não foram respondidas, como diagnóstico de diferenciação da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, classificação de gravidade ou até monitoramento da resposta terapêutica.

## 10.2 REFERÊNCIAS

Fleischmann, C.; Scherarg, A.; Adhikari, N. K.; Hartog, C. S.; Tsaganos, T.; Schlattmann, P.; Angus, D. C.; Reinhart, K. Assessment of global incidence and mortality of hospital treated sepsis: current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016; 193: 259– 72.

Singer, M.; Deutschman, C. S.; Seymour, C. W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G. R.; Chiche, J. D.; Coopersmith, C. M.; Hotchkiss, R. S.; Levy, M. M.; Marshall, J. C.; Martin, G. S.; Opal, S. M.; Rubenfeld, G. D.; Poll, T.; Vincent, J.L.; Angus, D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315:801-10.

Pierrakos, C.; Vincent, J. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010; 14, R15.

Roy, S.; Perez-Guaita, D.; Bowden, S.; Heraud, P.; Wood, B. R. Spectroscopy goes Viral: Diagnosis of hepatitis B and C virus infection from human sera using ATR-FTIR spectroscopy. *Clinical Spectroscopy.* 2020; S2666-0547: 30001-6.

Elumalai, B.; Prakasarao, A.; Ganesan, B.; Dornadulab, K.; Ganesana, S. Raman spectroscopic characterization of urine of normal and oral cancer subjects. *J. of Raman Spectroscopy.* 2014; 46: 84-93.

Elumalai, B.; Rajasekaran, R.; Aruna, P.; Koteeswaran, D.; Ganesan, S. High wavenumber Raman spectroscopy in the characterization of urinary metabolites of normal subjects, oral premalignant and malignant patients. *Spectrochim Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2017; 171: 52-59.

Bonnier, F.; Petijean, F.; Baker, M. J.; Byrne, H. J. Improved protocols for vibrational spectroscopic analysis of body fluids. *J. Biophotonics.* 2014;7: 167-179.

Rodrigues, A. G.; Galzerini, J. C. Espectroscopia de Infravermelho, Raman e de Fotoluminescência: Potencialidades e complementariedades. *Rev. Bras. Ens. Física.*

2012; 34: 4309.

Essendoubi, M.; Toubas, D.; Lepouse, C.; Leon, A.; Bourgeade, F.; Pinon, J. M. Manfait, M. Sockalingum, G. D. Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy. *J. of Microbiological Methods*. 2007; 71: 325-331.

Baker, J. M.; Hussain, S. R.; Lovergne, L.; Untereiner, V.; Hughes, C.; Lukaszewski, R. A.; Thieffin, G.; Sockalingum, G. D. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. *Chem. Soc. Rev.* 2016; 45: 1803-1818.

Yunanto, A.; Iskandar, A.; Utama, A.; Muthmainnah, N.; Suhartono, E. Early detection of neonatal sepsis using Fourier transformation infrared spectroscopy (FTIR). *AIP Conference Proceedings*. 2019;020026(1-6).

Gautam, R.; Deobagkar-Lee, M.; Majumdar, S.; Chandrasekar, B.; Victor, E.; Ahmed, S. M.; Wadhwa, N.; Verma, T.; Kumar, S.; Sundaresan, N. R.; Umapathy, S.; Nandi, D. Molecular profiling of sepsis in mice using Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. *J. Biophotonics*. 2016; 9: 67-82.

Batty, A. J.; Li, J.; Wang, X.; Ackerman, W. E.; Kirk, S. G.; White, W. M.; Wang, X.; Anastasakis, D.; Samavati, L.; Buhimschi, I.; Nelin, L. D.; Hafner, M.; Liu, Y. Dysregulation of Lipid Metabolism during Gram-Negative Sepsis in Mkp-1 Deficient Mice. *The J. of Immunology*. 2019; 202: 187.

Suhartono, E.; Yunanto, A.; Hartoyo, E.; Kania, N.; Utama, A. A.; Sari, R. K.; Putri, N. A.; Thalib, I. UV-visible Spectrophotometric as a Prospective Tool in Neonatal Sepsis. *The Indonesian Bio. J.* 2018;10: 74-8.

## 11 ANEXO II

### 11.1 ESTUDOS DE BIOMARCADORES DA SEPSE: DNA LIVRE CIRCULANTE

O diagnóstico de sepse permanece como um grande desafio para profissionais da área de saúde, e até o momento, não há nenhum padrão ouro para o diagnóstico de sepse. Novos biomarcadores, como o cfDNA, vem sendo estudados em sepse para melhorar o diagnóstico e permitir intervenção precoce.

Na sepse, o reconhecimento do diagnóstico precoce, severidade da síndrome sistêmica, bem como uma melhor estratificação dos pacientes com quadro séptico, são de grande importância. Portanto, a busca por um biomarcador ideal que possa ser usado com facilidade para confirmar a presença de infecção e sepse, tal como a troponina no diagnóstico de injúria miocárdica, tem sido alvo de pesquisas em todo o mundo.

Nos últimos anos, o cfDNA vem sendo estudado como um biomarcador em diversas áreas, sendo encontrado em diferentes fluidos corporais, como sangue, urina, líquido (AUCAMP et al, 2018)

Nos últimos anos, vem aumentando, de forma significativa, o número de pesquisas que investigam o cfDNA como biomarcador em diversas condições clínicas, incluindo pacientes com sepse (SAUKKONEN, et al, 2008, PIERRAKOS et al, 2010). Os principais objetivos destes estudos do cfDNA como novo biomarcador foram para avaliar o cfDNA como marcador de prognóstico de gravidade e mortalidade nos pacientes sépticos internados em UTI e comparar seus níveis em pacientes com ou sem sepse.

Neste contexto, estudamos a presença do cfDNA como marcador de gravidade em todas as classes de sepse, visto que a grande maioria dos estudos correlacionam cfDNA com mortalidade e não gravidade. Foram também incluídos no estudo, pacientes com infecção, em virtude da inexistência de dados na literatura de cfDNA nesta condição. Na avaliação de mortalidade, foi avaliado a mortalidade hospitalar geral e não somente pacientes internados em UTI.

Os achados demonstraram que o cfDNA foi um preditor independente de gravidade em pacientes sépticos, com critérios mais elevados em pacientes com sepse / choque comparadas ao grupo infecção, porém ainda com acurácia inferior ao SOFA pela análise da curva ROC, um escore clínico muito utilizado na prática clínica,

inclusive para classificar disfunção orgânica da sepse.

Em uma análise de subgrupo, pacientes com infecção que evoluíram com pior desfecho (sepse ou choque séptico), apresentaram níveis superiores de cfDNA colhidos no primeiro dia, em comparação com o grupo de infecção que não evoluiu com disfunção orgânica. Este dado, apesar da amostra reduzida, merece ser melhor investigado, já que praticamente não existem relatos na literatura de desfecho nos pacientes com somente infecção.

## 11.2 REFERÊNCIAS

AUCAMP, J. et al. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews*. 2018; 93:3, p.1649-1683.

SAUKKONEN, K. et al. Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock. *Clinical Chemistry*. 2008; 54:6, p.1000-1007.

PIERRAKOS, C.; VINCENT, J. L. Sepsis biomarkers: a review. *Critical Care*. 2010; 14: 1,p.15-32.

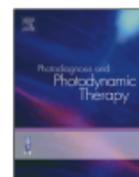
## 12 ANEXO III

## 12.1 ARTIGO PUBLICADO



Contents lists available at ScienceDirect

## Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/pdpdt](http://www.elsevier.com/locate/pdpdt)

## The potential of FT-IR spectroscopy for improving healthcare in sepsis – An animal model study

G.C. Pinto<sup>a</sup>, L.B. Leal<sup>a,\*</sup>, N.C. Magalhães<sup>b</sup>, M.F. Pereira<sup>a</sup>, P.F. Vassallo<sup>a,d</sup>, T.M. Pereira<sup>e</sup>, V.G. Barauna<sup>c</sup>, H.J. Byrne<sup>f</sup>, L.F.C.S. Carvalho<sup>b,g</sup>

<sup>a</sup> Post Graduation Program in Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Marechal Campos Ave, 1468, Maruípe, 29040-090, Vitória, Espírito Santo, Brazil

<sup>b</sup> Universidade de Taubaté. R. dos Operários, 09 - Centro, Taubaté, SP, 12020-340, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo (UFES), Marechal Campos Ave, 1468, Maruípe, 29040-090, Vitória, Espírito Santo, Brazil

<sup>d</sup> Clinical Hospital, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>e</sup> Universidade Federal do Estado de São Paulo. R. Talim, 330 - Vila Nair, São José dos Campos, SP, 12231-0, Brazil

<sup>f</sup> FOCAS Research Institute, Technological University Dublin, Kevin Street, Dublin 8, Ireland

<sup>g</sup> Centro Universitário Braz Cubas. Av. Francisco Rodrigues Filho, 1233 - Vila Mogilar, Mogi das Cruzes, SP, 08773-380, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
FT-IR  
Spectroscopy  
Sepsis diagnosis  
Optical diagnosis

## ABSTRACT

Fourier Transform-Infrared (FT-IR) absorption spectroscopy has been used to investigate pathophysiological changes caused by sepsis. Sepsis has been defined as a potentially fatal organic dysfunction caused by a dysregulated host response to infection and can lead a patient to risk of death. This study used samples consisting of the blood plasma of mice which were induced to sepsis state, compared to a healthy group using FT-IR associated with attenuated total reflectance (ATR) spectroscopy. For statistical analysis, principal components analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA) were applied, independently, to the second derivative spectra of both the fingerprint (900–1800 cm<sup>-1</sup>) and the high wavenumber (2800–3100 cm<sup>-1</sup>) regions. The technique efficiently differentiated the blood plasma of the two groups, sepsis and healthy mice, the analysis indicating that fatty acids and lipids in the blood samples could be an important biomarker of sepsis.

### 1. Introduction

The early diagnosis and management to 59% of acute conditions are vital in order to improve the chances of survival, and sepsis is one of them. Sepsis is one of the principal causes of death worldwide, mortality ranging from 18 % to 59 %, depending on the evolution and/or severity of the case, resulting in ~5 million deaths annually [1]. Sepsis is a disorder, and cannot be considered a disease because it cannot be clinically recognized by diagnostic tests [2]. A disorder is defined as a potentially fatal organic dysfunction caused by a dysregulated host response to infection and can lead a patient to risk of death [3]. Nevertheless, septic syndrome has different, progressive, degrees of severity that are divided into infection, sepsis, and septic shock, and correct and early diagnosis is the key point for good patient treatment and recovery [3]. Currently, the early diagnosis is performed by evaluation of changes in clinical, mental, and functional status, and vital signs and

using clinical scores, SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) and qSOFA (quick SOFA) [1]. However, the search for a biochemical marker, or any diagnostic tool, that can be used to promptly confirm infection and onset of sepsis has been the source of intense research [4]. The range of different compounds that have been described, either as diagnostic markers of the condition or to prognosticate between a good and a poor outcome in sepsis, includes; acute-phase proteins such as C reactive protein [5], procalcitonin, cell-free DNA (cfDNA), inflammatory (pro and anti-) cytokines, cell surface proteins (adhesion molecules, for instance), and markers of coagulation [4]. However, an accurate diagnostic confirmation, to differentiate between systemic inflammation conditions and sepsis, is still lacking and the challenge remains for prediction of clinical responses to therapies and survival probabilities of intensive care [4–6].

Sepsis is a disorder, and cannot be considered a disease, because it cannot be clinically recognised by diagnostic tests [6]. Sepsis has been

\* Corresponding author.

E-mail address: [leal.leob@gmail.com](mailto:leal.leob@gmail.com) (L.B. Leal).

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102312>

Received 21 November 2020; Received in revised form 7 April 2021; Accepted 23 April 2021

1572-1000/© 2021

defined as a potentially fatal organic dysfunction caused by a dysregulated host response to infection and can lead a patient to risk of death [1,7]. Septic syndrome has different degrees of severity that are divided into infection, sepsis, and septic shock, and correct and early diagnosis is key to good patient treatment and recovery [8,9]. There is no defined gold standard test for sepsis diagnosis, and there is an unmet need for a tool to minimise false positives and false negatives [3,7].

In the search for improved clinical diagnostic and patient monitoring techniques, the reduction of the invasiveness of sampling techniques is of course one of the main challenges to improve patient comfort and diagnostics. Analysis based on urine, saliva and blood, using biomarkers such as the quantity of cell-free DNA (cfDNA) circulating in human blood [10–12], is thus of potential benefit, because these fluids have contact to the organs in the human body. Another positive point in the analysis is the ease and availability of the collection for repetition of tests, enabling monitoring of the progression of diseases or treatments [13–19].

A range of spectroscopic approaches to analysis and diagnosis of sepsis have recently been explored, notably UV–vis absorption spectroscopy, as a prospective tool for monitoring neonatal sepsis in blood specimens taken from newborns [20], and near infrared spectroscopy of frontal cerebral tissue [21], tissue perfusion [22] and oxygenation [23] monitoring in vivo, in patients with severe sepsis and septic shock. Raman and infrared absorption spectroscopies have, in general, attracted a lot of attention over the past decades for biomedical applications [24–26], and particularly, more recently for analysis of biofluids, including, saliva, bile, breast milk, pancreatic juice, tears, blood, urine [15–18,27]. Specifically in the context of sepsis, Raman spectroscopy of blood plasma of ICU patients has been explored for rapid differentiation of non-infectious systemic inflammatory response syndrome and sepsis [28], while Fourier Transform Infrared absorption (FTIR) spectroscopy has been employed for early detection of neonatal sepsis [29] and analysis of the organs and serum of sepsis induced in mice [30,31].

While the FTIR micro analysis provided valuable insight into the biochemical imbalances associated with sepsis, including a decrease in glycogen and protein/lipid ratio and increase in DNA and cholesteryl esters, in serum samples of septic mice [20], a more rapid access, low

cost system is desirable. In this context, the modality of Attenuated Total Reflection FTIR (ATR-FTIR) has become particularly popular for biofluid measurement, due to the ease of application, and field deploy ability of the relatively low cost technique, and applications for analysis of dried human blood samples, for diagnosis of ovarian cancer [32], breast cancer [33], as well as Alzheimer's disease [34,35], have been demonstrated [36].

The intention of our study is to mimic the initial presentation of the patient, and therefore requirement for clinical diagnosis of sepsis, before any therapeutic intervention has been initiated (Fig. 1). It is envisioned that initial FTIR screening will be of benefit at the stage of the first presentation of a patient in the intensive care unit (ICU), to promptly confirm infection and onset of sepsis, with follow up monitoring over the subsequent days. The first purpose is therefore to identify individuals with or without sepsis, while further studies can explore the influences on the FTIR profiles of pharmacologic and nutritional interventions.

In our study, we made use of an animal model in which we could control whether the animal was in a state of sepsis or not. Animal models have been widely used for sepsis studies [37], to advance the knowledge of this syndrome. Although animal models have limitations and are not under the same conditions observed in humans, the use of animals, in this study, was a starting point (pre-clinical study) to analyze the feasibility of transferring interpretations, obtained from tests performed on mice, for future use of FTIR in the human. The idea is to achieve the closest possible proximity of this model to the real event, which is proven through clinical and laboratory parameters, as seen in our study. Other studies using animal model in sepsis have been carried out in order to show the effectiveness of the FT-IR technique [30].

In the present study, ATR-FTIR has been used to elucidate changes in the biochemistry of blood caused by sepsis induced in mice. Principal components analysis (PCA) and linear discrimination analysis (PCA-LDA) are employed to discriminate the samples from the blood of normal mice, and identify the underlying source of the discrimination.

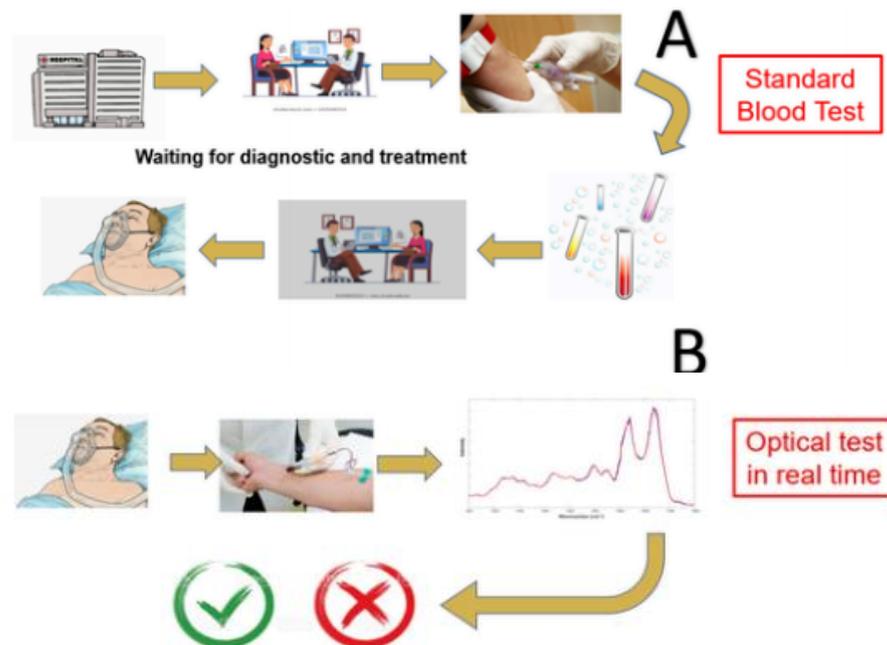


Fig. 1. A: Workflow for reducing patient waiting time for diagnostic and sepsis treatment. B: Sepsis diagnosis in real time using the ATR-FTIR spectroscopic approach.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples (animals)

Balb/c mice were bred and maintained using sterilised bedding, filtered water and pelleted food. The animals were housed in standard cages. Food and water were provided ad libitum. Room temperature was kept at  $23 \pm 1$  °C, and a 12:12 dark-light cycle was maintained throughout the experimental period. Male animals, 12 weeks of age, were used for experiments. The animals were randomly divided into two groups: Sham (n = 6), and Sepsis (n = 6). The experimental procedure was conducted in accordance with the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the protocol was approved by the Ethics Committee for Experimental Animal Use, established by the Federal University of Espírito Santo under reference number 03/2018.

### 2.2. Sample preparation (sepsis induction and plasma assays)

The sham group was injected with sterile phosphate-buffered saline (PBS), while the sepsis group was injected with PBS with *Staphylococcus Aureus*, to ensure that the spectroscopically measured effects are caused by the inoculum and not the PBS. To induce the sepsis response, mice were infected by an intraperitoneal inoculation of 150 µL PBS containing  $\sim 3 \times 10^8$  *S. aureus* (ATCC 25923 strain). The animals were evaluated after 18–24 h. The animals were euthanised and the blood obtained through cardiac puncture. 800 µL blood samples were collected in tubes and were centrifuged at 3000 rpm for 20 min at 4 °C. The plasma was transferred to sample tubes and immediately stored at –80 °C until further analysis.

### 2.3. Assessment of the severity of sepsis

At 24 h after infection, mice were scored for severity of sepsis. Our study used a severity score for sepsis [38], allowing to distinguish and classify, according to the animals' clinical symptoms, from mild to severe sepsis. In this assessment, higher scores reflect increased severity. Mice were scored based on the presence or absence of each scored 1 or 0, following variables: piloerection; curved trunk; alterations on gait; seizures; limb paralysis; coma; respiratory rate; skin color alterations; heart rate; lacrimation; palpebral closure; grip strength; limb, abdominal, body tone and body temperature alterations. Animals with a 0 score were considered healthy. Mild sepsis for  $\leq 3$  score, moderate sepsis 4–7 score, severe sepsis 8–11 score.

For the study we choose to work with animals that present severe sepsis but not septic shock. So, although the use of animal models allows you study these different states, in our study after the induction of the septic event, about 78 % develop signs of severe sepsis, then the others were discarded.

### 2.4. cfDNA concentration assay

Small quantities of cfDNA are found circulating in healthy people. However, increased quantities are found in patients with conditions such as sepsis [39], cancer [40], trauma [41] and exercise training [42]. A standard curve with seven concentrations was generated by serial dilution of commercial salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich). The curve was evaluated in triplicate resulting in a standard curve used to calculate the DNA concentrations. The cfDNA concentrations of serum samples were directly analysed with a fluorescent nuclear stain (SYBR Gold). SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain was diluted first at 1:1000 in dimethyl sulphoxide (DMSO) and then at 1:8 in PBS. Ten microlitres of serum were applied to a black 96-well plates. Forty microlitres of diluted SYBR Gold were added to each well (final dilution 1:10,000) and fluorescence was measured with a Varioskan Flash fluorimeter

(Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) at an emission wavelength of 535 nm and an excitation wavelength of 485 nm [43].

### 2.5. ATR-FTIR spectroscopy

The equipment used was an Agilent spectrometer, Cary 630, equipped with ATR and employing a 45° single reflection ZnSe crystal. The spectral range between 650 to 4000  $\text{cm}^{-1}$  was recorded with 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution. Consistent with previous studies, the sample was placed directly on the crystal, after which there was a mean waiting time of two minutes for water evaporation before recording the spectra. The process of deposition of serum onto the ATR crystal has been extensively studied [15,19,27]. The thickness of the drop is determined in part by the volume deposited, and relative to the penetration depth of the evanescent wave, the optimum volume to ensure full thickness sampling has been determined to be 2–4 µL. Although the well-known Vroman [44] or “coffee-ring” effect results in an inhomogeneous lateral deposition of the serum constituents, it has been shown that their contributions are integrated, using a drop size of 4 µL.

Other instrumental parameters from Cary 630 consisted of Happ-Genzel apodization, Mertz-phase correction and no zero fill factor. In these specifications, all spectra were obtained with the same parameters, so we were able to guarantee that all samples were analyzed in the same way, thus ensuring that any possible confounding factors, such as differing sample penetration across the spectral range, was the same for all samples.

The sample volume used in this study was 4 µL of plasma, which deposited onto the ATR crystal, ensuring that the dried droplet was fully contained within the sampling area. The analysis was performed with 32 spectra scans and 32 background scans. For each sample, 3 spectra were collected, resulting in 18 spectra per group. After each analysis, the sample was removed from the crystal with the aid of absorbent paper and the crystal was cleaned with 70 % alcohol for total removal, thus avoiding contamination between samples [45].

### 2.6. Data analysis

#### 2.6.1. Data preprocessing

The raw spectral dataset is of samples from 12 mice (6 controls and 6 sepsis), for each of which spectra were collected in triplicate (18 from normal and 18 from sepsis) and each one contains 1798 absorbance points equally spaced between 650 and 4000  $\text{cm}^{-1}$ . The experimental data were imported to the MATLAB environment using routines written by some of the authors. Before the multivariate analysis, it is necessary to perform data preprocessing to remove variabilities in the dataset that are not related to biochemical changes among the samples. The preprocessing included conversion of all data to the second derivative. In order to remove the noise, a Savitsky-Golay smoothing filter (2nd polynomial order using 11 points) was used. After smoothing, the data was split into two regions: 650–1800  $\text{cm}^{-1}$  (fingerprint) and 2800–3100  $\text{cm}^{-1}$  (high wavenumber), excluding the so-called “silent region” from 1800–2800  $\text{cm}^{-1}$ , as well as the region above 3100  $\text{cm}^{-1}$ , which is dominated by residual water, and the spectral regions were vector normalised separately.

#### 2.6.2. Multivariate analysis - data analysis

After performing the data preprocessing for the analysis, the principal components analysis (PCA) was performed directly from the data of the second derivative spectra. Second derivative spectroscopy is a commonly employed technique which sharpens the spectroscopic bands and makes them more identifiable [46–48]. In the current study, the technique was seen to significantly improve the ability to differentiate the spectra of control, and sepsis samples. PCA is an orthogonal transformation from the original dataset into a new coordinate system in which the broad range of variance can be explained using a low number of

variables, termed scores, and new linearly independent variables termed Principal Components. As a consequence, all collinearity that exists in the original data set coordinate system is removed.

After the PCA transform, linear discriminant analysis (LDA) was performed. The goal of the analysis is to evaluate the ability of the ATR-FTIR technique to discriminate the normal samples from sepsis ones. LDA is a classification algorithm based on a Mahalanobis distance calculation. This way of analysis can be considered one pillar of data analysis, finding a projection of the data points onto a one-dimensional space in which the classes are well separated. LDA is a supervised technique, whose performance depends heavily on the availability of appropriately classified data, in this case provided by PCA [25,49,50]. In this study LDA was performed using the first scores that represent 95 % of variance of each dataset ( $650\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$  and  $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ ). To avoid overfitting, leave one mouse out cross validation was used with the LDA method. To check the performance of the LDA classification, the sensitivity and specificity were calculated using 1, 2, 3, 4 and 5 PCs.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. cfDNA and sepsis

Fig. 2 shows that septic mice had increased levels of cfDNA (Sham;  $10.7 \pm 1.1$  vs Sepsis;  $17.1 \pm 1.2$ , ng/ $\mu\text{l}$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2A) and the clinical scores for severity of sepsis were determined (Sham;  $0.5 \pm 0.2$  vs Sepsis;  $5.3 \pm 0.2$ ,  $p < 0.05$  (Fig. 2B)). Fig. 2 C and D show examples of a healthy mouse and a mouse with induced sepsis, respectively.

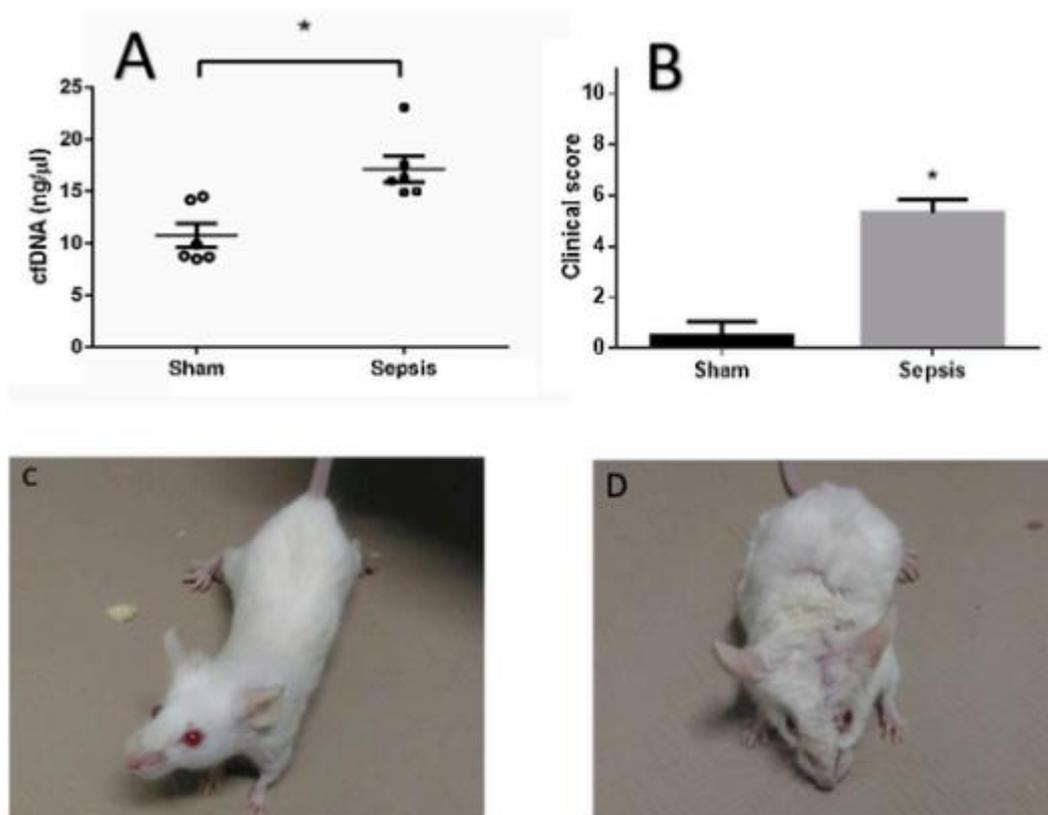


Fig. 2. cfDNA levels (A) and clinical score for severity of sepsis (B) in Sham and Sepsis groups. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. \*  $P < 0.05$ , Student t-test,  $n = 6$  (C) Healthy mouse (D) Mouse with sepsis.

#### 3.2. Mean spectra and second derivative analysis

Mean (raw) spectra of the fingerprint and high wavenumber areas were obtained and are shown in Fig. 3A&B, respectively. The blue lines represent the control group, and the red the sepsis group. Vibrational modes and structural components in biological samples have been previously described by Movasaghi et al., 2008 [51], and 22 identifiable features of the ATR spectra of the mice blood plasma samples have been identified and assigned in Table 1. Comparison of the two groups indicates notable differences in the peaks at  $2852$  and  $2928\text{ cm}^{-1}$  (lipids and fatty acids). Small differences in peaks representing proteins ( $1469$ ,  $1539$ ,  $1631$  and  $1647\text{ cm}^{-1}$ ), lipids and fatty acids ( $1744$  and  $2874\text{ cm}^{-1}$ ) are also apparent (Fig. 3, dashed lines).

To better identify the contributing spectral features, the mean of the second derivative fingerprint and high wavenumber spectra for each sample was calculated, after normalisation, as shown in Fig. 4. It was possible to observe in the second derivative features, the strong contribution of fatty acids conformations in the fingerprint region of the spectra (Fig. 4A).

In the case of both second derivative and mean spectra of the high wavenumber region (Fig. 3B and B), the absorbance of the peaks at  $2852$  and  $2928\text{ cm}^{-1}$  are seen to decrease in the sepsis group, while those at  $2874$  and  $2958\text{ cm}^{-1}$  are seen to increase, relative to the control. The vibrational mode assignments of these peaks are detailed in Table 1, as C-H, NH— stretching and symmetric stretching vibrations of  $\text{CH}_2$  groups of acyl chains, which is due to fatty acids and lipids alterations in sepsis compared to health samples. In fact, in this region, a clearer signal could be observed showing a real alteration in these structural components. Nevertheless, the derivatisation enables more subtle differences in the fingerprint region, the sepsis samples exhibiting relatively stronger features at  $1469$ ,  $1539$ ,  $\text{cm}^{-1}$  (lipids) and  $1631$ ,

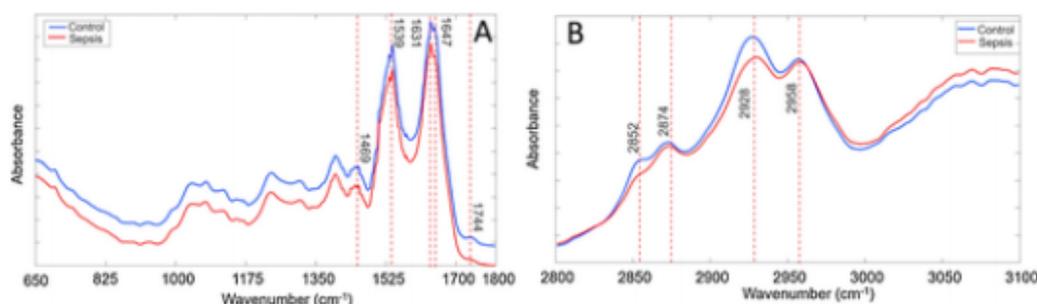


Fig. 3. A: Mean spectra of fingerprint of control group (blue) and sepsis group (red). B: Mean spectra of high wavenumber of control group (blue) and sepsis group (red).

Table 1

Assignment of IR bands obtained from 2<sup>nd</sup> derivative of blood sample spectra (Gautam et al., 2015; Movasaghi et al., 2008).

Bands (cm <sup>-1</sup> )	Vibrational Mode	Group
682	CH out-of-plane bending vibrations	
851	C endo/anti (A-form helix) conformation	DNA
1036	Stretching coupled with C-O Bending	Glycogen
1081	Phosphate I in RNA	RNA
1123	Nc-O of carbohydrates	Carbohydrates
1135	Oligosaccharide C-OH stretching band 2-Methylmannoside	
1177	CO-O-C asymmetric stretch	Cholesteryl esters
1416	Deformation C-H, N-H, stretching C-N	
1469	CH <sub>2</sub> bending of the acyl chains of lipids	Lipids
1480	Amide II	Protein
1497	C = C, deformation C-H	
1539	CH <sub>2</sub> bending of the acyl chains of lipids B-sheet of amide II	Lipids
1551	Region of the base vibrations	
1567	Region of the base vibrations	
1631	Amide I region	Protein
1647	Amide I	Protein
1690	Peak of nucleic acids due to the base Carbonyl stretching and ring breathing mode	DNA
1744	Ester group (C550) vibration of Triglycerides	Lipids/Cholesteryl esters
2852	Fatty acid	Lipids
2874	Stretching C-H, N-H Symmetric stretching vibration of CH <sub>3</sub> of acyl chains (lipids)	Lipids
2928	Fatty acid	Lipids
2958	Stretching C-H	

1647 cm<sup>-1</sup> (proteins). Of note are the features at 1177 and 1744 cm<sup>-1</sup>, which were also identified by Gautam et al., and associated with the fatty acid, cholesteryl acid [30].

### 3.3. Principal components analysis of fingerprint region

In Fig. 5A, the PCA scatter plot of the 2<sup>nd</sup> derivative spectra of the 650–1800 cm<sup>-1</sup> region of sepsis samples (red dots) compared to the

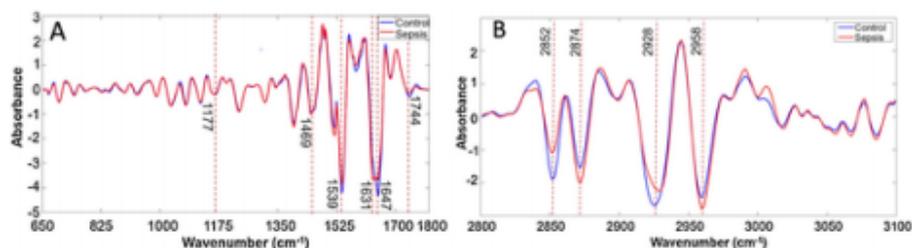


Fig. 4. A: Second derivative of mean fingerprint spectra. Blue line is control group and red line is sepsis group. B: Second derivative of mean high wavenumber spectra. Blue line is control group and red line is sepsis group.

control samples (blue dots) is shown, indicating a difference of the samples in the scatter plot of PC3 vs PC1, according to PC3. Fig. 5B shows the loading plot for PC3, in which the positive peaks represent control samples and the negative represents the sepsis samples. Among the peaks that are responsible for the separation in the fingerprint region are those attributed to lipids (1177, 1469, 1539, 1744 cm<sup>-1</sup>) and protein conformational changes (1480, 1556, 1631, 1647 cm<sup>-1</sup>).

### 3.4. Principal components analysis of high wavenumber region

In Fig. 6A, the PCA scatter plot of the 2<sup>nd</sup> derivative high wavenumber region spectra of control samples (red dots) compared to the sepsis samples (black dots) is shown, indicating a difference of samples according to the scores of PC1. Fig. 6B shows the loading plot for PC1, in which the positive peaks represent control samples and negative represent the sepsis samples. The four principal peaks that are responsible for the separation in the high wavenumber region are associated with lipids (2852, 2874, 2928, 2958 cm<sup>-1</sup>).

### 3.5. Principal components analysis with linear discriminant analysis (PCA-LDA)

The basic premise of diagnostic applications of biospectroscopy, and indeed any other diagnostic technique, that is, that the effects of the pathology to be diagnosed are greater than the intra and inter patient variability. This has previously been shown to be the case for the examples of measurement by FTIR of iron levels [52], diagnosis of gliomas [15,27] and actinic cheilitis [50], while Gautam et al. have demonstrated the feasibility for sepsis evaluation. Nevertheless, confounding factors can reduce the spectroscopic contrast between samples of healthy patients and those presenting with a pathology, as in the case of smoking in the identification of potentially malignant lesions from cytological biopsies in oral cancer patients [53]. The multivariate technique of PCA-LDA enables a quantitative assessment of the probability of false positive and false negative results in the data base, in terms of the sensitivity and specificity of the measurement (Fig. 7).

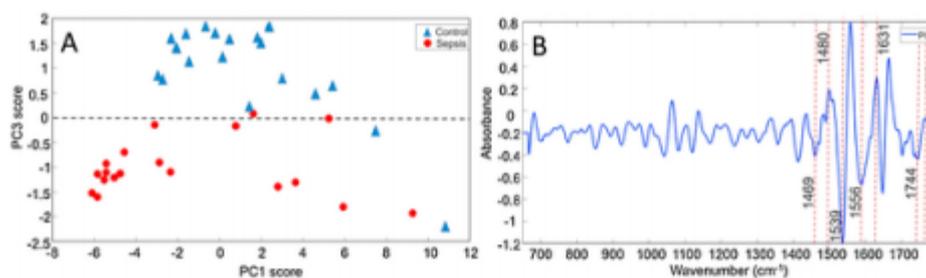


Fig. 5. A: PCA scores plot of PC3 vs PC1 in the fingerprint region. Red dots represent the sepsis group and blue triangles the control group. B: Loading plot of PC3 in the fingerprint region.

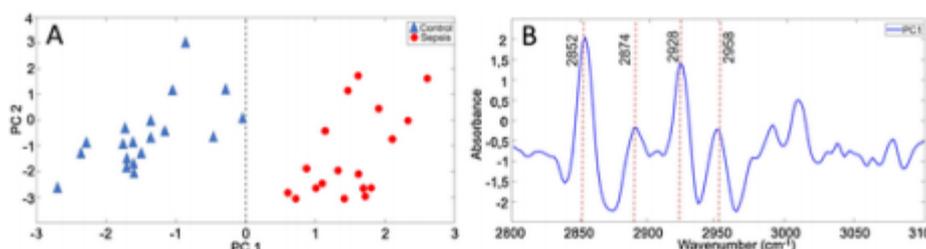


Fig. 6. A: PCA scores plot of PC2 vs PC1 in the high wavenumber region. Red dots represent the sepsis group and blue triangles the control group. B: Loading plot of PC1 in the high wavenumber region.

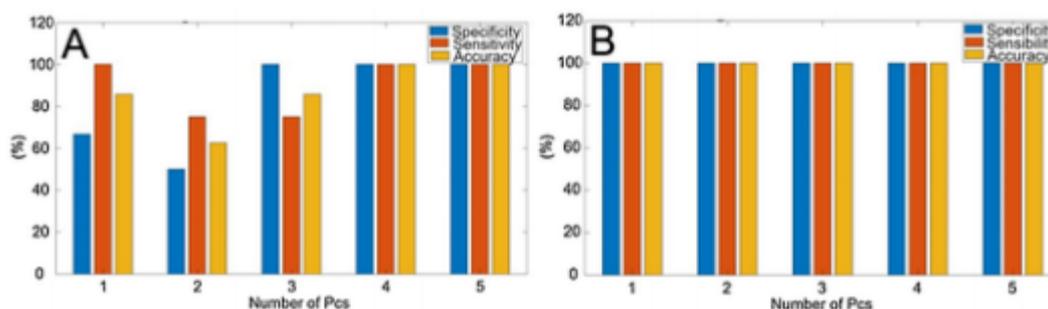


Fig. 7. LDA classifications as for number of PCs using to obtained accuracy (bar green), sensitivity (bar red) and specificity (bar blue). A: Fingerprint (left) and B: High wavenumber (Right).

PCA-LDA was performed in both the fingerprint ( $650\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ ) and high wave number ( $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ ) regions, using 1–5 PCs. To avoid overfitting, leave one mouse out cross validation was used with the LDA method. As shown in Fig. 5A, in the fingerprint region, 100 % sensitivity was obtained with one PC, while using four and five PCs, 100 % sensitivity, accuracy and specificity were obtained. In the high wavenumber region, (Fig. 5B) 100 % accuracy, sensitivity and specificity was obtained with one to five PCs.

### 3.6. Vibrational modes and biochemical indicators of sepsis

The findings of the ATR - FTIR spectroscopic analysis of the plasma of septic mice indicate that there is a marked alteration in fatty acid compounds when compared to the healthy group. Increased levels of circulating triglyceride-rich lipoproteins and free fatty acids have already been described as a fundamental metabolic response to critical illness such as sepsis [54–62]. It has also been described as “lipidemia” of sepsis by Gallin et al. [60]. The increased sympathetic tonus and catecholamine levels in the circulation increase the release of free fatty acid (FFA) from adipose tissue. Increased levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 cytokines may also inhibit lipoprotein lipase synthesis, leading to a decrease of the rate of triglyceride clearance, which suggests that hypertriglyceridemia can also be observed in the absence of elevated plasma FFA levels [62].

Clinical experience has shown that it is important to diagnose the patient at the initial stages of sepsis. The intention of our study is therefore to mimic the initial presentation of the patient, and therefore requirement for clinical diagnosis of sepsis, before any therapeutic intervention has been initiated, while further studies can explore the influences on the FTIR profiles of pharmacologic and nutritional interventions.

Although the role of adipose tissue in the response to sepsis has been described, there are still few studies evaluating lipolysis in a critical care setting. Ilias et al., in 2014, showed that patients with septic shock displayed more pronounced subcutaneous tissue lipolysis and more circulating lipids compared to patients without shock [61]. The authors also showed correlations between subcutaneous tissue lipolysis, plasma FFAs and catecholamine levels during the subacute of the septic shock.

Rival et al., 2013 [62] studied 37 patients in the early phase of septic shock in intensive care units. Patients presented hypocholesterolemia and hypertriglyceridemia. The authors described low concentrations of phospholipid fatty acids, specifically n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids with a high n-6/n-3 ratio. They attributed the profile to activation of hepatic lipogenesis that could lead to hepatic steatosis, elevated adipose tissue lipolysis, increased free radical attack of FFA by oxidative stress and an over-production of inflammatory lipid mediators/cytokines.

Some small intervention studies have already shown that intensive glycemic control in septic patients reduced FFA levels [58] and these can be a therapeutic target, since it has been previously described that no survivors from sepsis present higher serum levels of FFAs [36]. Also, FFA levels were found elevated in septic patients with cardiac mitochondrial damage and changes in heart rate variability, demonstrating a possible cardiac toxicity [36].

In sepsis patients, alterations in the levels of various plasma lipids have also been described [57,59,60]. The current ATR-FTIR study indicates that FFAs are a factor associated with sepsis in mice, a result which is largely consistent with studies of human septic patients, illustrating the similarity in sepsis-induced plasma lipid changes between humans and mice [36,50,59,61]. The increase in plasma fatty acids in sepsis is partly attributable to the increased release of FFA from adipose tissue induced during the septic event [62]. This metabolic dysregulation has been reported in septic patients, that commonly present hypocholesterolemia and hypertriglyceridemia [56,60]. FFA imbalance has been associated with sepsis mortality in care units [56,60].

Certainly, it is an important question and still a clinical challenge for any new diagnostic technique to distinguish patients with infection from those with only inflammation conditions. Changes in the fatty acids profile of septic patients has been described and associated with poor prognosis [63,64]. The observations of the study presented here are consistent with these observations, as are those of Gautam et al. and Yunanto et al. (2019) indicating that the vibrational spectroscopic technique of FTIR can be employed as an early indicator of sepsis in patients [29,30]. Further studies using the similar, and complementary technique of Raman spectroscopy, have shown photonic strategies to monitor response to treatment in patients with infectious disease, sepsis, and septic shock, concluding that these technologies can help to evaluate treatment strategies for their capacity to prevent sepsis-associated organ dysfunctions, Tannert et al. 2017 and Neugebauer et al. 2014 have demonstrated the ability to rapidly differentiate non-infectious systemic inflammatory response syndrome and sepsis from the blood plasma of ICU patients [28,65]. While our own study is intended to be a proof of principle to show that FTIR can be a potential tool to aid in the early diagnosis of sepsis, we have already initiated a study with samples of septic patients, and we hope to confirm the application of FTIR as a quick tool that helps and step up the diagnosis, for early initiation of therapeutic protocols for the treatment of sepsis.

Vibrational spectroscopy is able to undertake biomolecular analysis of a sepsis condition, assisting the diagnosis and prognosis of patients susceptible to infectious processes, being an interesting tool in health care. These findings in an animal sepsis model are of interest, because, through a cheap, rapid and low-cost technology, it was possible to very clearly differentiate a pattern in the sepsis samples when compared to healthy control. This is a first step towards advancing studies in critical areas of sepsis diagnosis and treatment that have not yet been answered, such as, diagnostic differentiation of systemic inflammatory response syndrome, and classification of sepsis severity and even monitoring of therapeutic response [36,66].

Gautam et al., [30] conducted an FTIR microspectroscopic study of frozen mouse liver, spleen and serum, as a function of (post-infection) time, up to 12 h [30]. Their results mainly indicated a decrease in glycogen and protein/lipid ratio coupled with an increase in DNA and cholesteryl esters in all samples of infected mice. The results of the current study are consistent with the findings of the microscopic study, although it should be noted that plasma was used, rather than serum in the study of Gautam et al. At 24 h post infection, fatty acid content is identified as a strong spectroscopic biomarker for sepsis. Importantly, the ATR technique employed in the current study is considerably less intricate than the microscopic study, and ultimately much more amenable and translatable to the clinical environment [67].

Our results confirm that quantitative plasma testing by ATR-FTIR spectroscopy has great promise of becoming a clinically useful diagnostic

tool for management and differentiation of patients with infections or sepsis risk using blood samples (and their derivatives, serum and plasma) [29,36,68–75]. It is important to note that these preliminary data provide a perspective for diagnostic accuracy of this blood test, with the caveats of small numbers of animals ( $n = 6$ ). However, these advances suggest that clinical translation of ATR-FTIR spectroscopy for rapid biochemical analysis can be a reality, especially, in the screening and monitoring, allowing early recovery whilst also bringing cost benefits to the health services.

Our study aimed to be a proof of principle to show that FTIR can be a potential tool to aid in the early diagnosis of sepsis. Although there are some studies involving FT-IR and Raman spectroscopy in sepsis processes, there are few on this topic in the literature, making the present work relevant to establishing the potential of vibrational spectroscopy techniques for the diagnosis of sepsis. In our study, we were able to demonstrate in a fully controlled sample, the effectiveness of the technique using both spectral regions, fingerprint and high wave numbers.

These findings in an animal sepsis model are of relevance because, through a rapid and low-cost technology, it was possible to very clearly differentiate a pattern in the sepsis samples when compared to control. This is a first step towards advancing studies in critical areas of sepsis diagnosis and treatment that have not yet been answered, such as, diagnosis differentiation of systemic inflammatory response syndrome, and classification of sepsis severity and even monitoring of therapeutic response. We have already initiated a study with samples of septic patients, and we hope to confirm the application of FTIR as a rapid tool improve the early diagnosis of sepsis, for early initiation of therapeutic protocols for the treatment. In this context, it will be important to explore, for example, intra vs inter patient variances, at all stages of sepsis, as well as any potential confounding effects of patient treatment.

#### 4. Conclusion

In the present study, we have used the ATR-FTIR spectroscopic technique to elucidate changes in the biochemical content of blood caused by septicemia. The results are important from a biochemical point of view, and showed mainly changes in the vibrational modes of proteins and lipids. The sample groups were well discriminated in both the fingerprint region and the high wave number region using Principal Component Analysis and Linear Discriminant Analysis provided a high degree of sensitivity and specificity. The technique is easily applicable to study human samples, and if it is found to be efficient for rapid screening of blood in sepsis groups, the fatty acid region may be identified as an important biomarker of this pathological type. It is important to point out that the technique is rapid and label free, and the use in large scales could be possible in the future, allowing greater efficiency with corresponding decreases in mortality, morbidity and improved multidisciplinary team care.

#### Funding

Luis Felipe CS Carvalho is funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – PNP ODONTOLOGIA UNITAU and Leonardo Leal was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES). This study was supported by FAPES (#151/2020 and #277/2020), CNPq (#401870/2020-0).

..

#### Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

## Acknowledgements

Luis Felipe CS Carvalho would like to acknowledge Centro Universitário Braz Cubas for Scientific Research Program. All the authors would like to thank LabPetro (UFES, Brazil) for performing FTIR measurements (Technical Cooperation Agreements nos. 0050.0022844.06.4).

## References

- C. Fleischmann, A. Scherag, N.K. Adhikari, C.S. Hartog, T. Baganos, P. Schlattmann, D.C. Angus, K. Reinhart, Assessment of global incidence and mortality of hospital treated sepsis: current estimates and limitations, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193 (3) (2016) 259–272.
- T. Bota, F.J. Gella, C. Proffils, G. Ferard, M. Hadjivasiliou, F. Hoerder, R. Schiede, F. Canalis, Production and certification of an enzyme reference material for adenosine desaminase 1 (BCR 647), *Int. J. Clin. Chem. Diagn. Lab. Med.* 306 (2001) 79–89.
- M.F.R.C.P. Singer, S. Clifford, M.S. Deutschman, C.W. Seymour, The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3), *JAMA* 315 (8) (2016) 801–810.
- C. Pierrakos, J. Vincent, Sepsis biomarkers: a review, *Crit Care* 14 (2010) R15.
- N. Al-Subaie, T. Reynolds, A. Myers, R. Sunderland, A. Rhodes, R.M. Grounds, G.M. Hall, C-reactive protein as a predictor of outcome after discharge from the intensive care: a prospective observational study, *Br. J. Anaesth.* 105 (2010) 318–325.
- R. Volp, N. Alénas, V. Costa, P. Minim, J. Bressan, Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Prever a Síndrome Metabólica, *Arqu. Bras. Endocri. Metabol.* 58 (3) (2008).
- A. Keeley, P. Hine, E. Nsutebu, The recognition and management of sepsis and septic shock: a guide for non-intensivists, *Postgrad. Med. J.* 93 (1104) (2017) 1–9.
- J.M. Mylotte, What is the role of nursing homes in the surviving sepsis campaign?, *JAMA* 21 (1) (2019) 41–45.
- M.F.C. Barreto, M.S.G. Dellarozza, G. Kerbauy, C.M.C. Grion, Sepsis in a university hospital: a prospective study for the cost analysis of patients' hospitalization, *Rev. da Esc. de Enf. da USP* 50 (2) (2016) 302–308.
- C.W. Seymour, F. Gesten, H.C. Prescott, M.E. Friedrich, T.J. Iwashyna, G.S. Phillips, M.M. Levy, Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis, *New Engl. J. Med.* 376 (23) (2017) 2235–2244.
- A. Rhodes, L.E. Evans, W. Alhazzani, M.M. Levy, M. Antonelli, R. Ferrer, M.E. Nunnally, Surviving sepsis campaign, *Crit. Care Med.* 45 (3) (2017) 486–552.
- M.M. Levy, L.E. Evans, A. Rhodes, The surviving sepsis campaign bundle: 2018 update, *Crit. Care Med.* 46 (6) (2018) 997–1000.
- N. Ndadane, R.C. Mahara, The epidemiology of sepsis in a district hospital emergency centre in Durban, KwaZulu natal, *Afr. J. Emerg. Med.* 9 (3) (2019) 123–126.
- C.W. Seymour, V.X. Liu, T.J. Iwashyna, F.M. Brunkhorst, T.D. Rea, A. Scherag, G. Rubenfeld, J.M. Kahn, M. Shankar-Hari, M. Singer, C.S. Deutschman, J.G. Escobar, D.C. Angus, Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3), *JAMA* 315 (8) (2016) 762–774.
- F. Bonnier, F. Petitjean, M.J. Baker, H.J. Byrne, Improved protocols for vibrational spectroscopic analysis of body fluids, *J. Biophotonics* 7 (3) (2014) 167–179.
- A.G. Rodrigues, J.C. Galzerini, Espectroscopia de Infravermelho, Raman e de Fotoluminescência: Potencialidades e complementariedades, *Rev. Bras. Ens. Física.* 34 (2012) 4309.
- M. Essendoubi, D. Touba, C. Lepouse, A. Leon, F. Bourgeade, J.M. Piron, M. Mañai, G.D. Sockalingum, Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy, *J. of Microbiological Methods* 71 (2007) 325–331.
- J.M. Baker, S.R. Hussain, L. Lovergne, V. Untereiner, C. Hughes, R.A. Lukaszewski, G. Thieffin, G.D. Sockalingum, Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review, *Chem. Soc. Rev.* 45 (7) (2016) 1803–1818.
- F. Bonnier, G. Brachet, R. Duong, T. Sojirrin, R. Respaud, N. Aubrey, M.J. Baker, H.J. Byrne, I. Choupa, Screening the low molecular weight fraction of human serum using ATR-IR spectroscopy, *J. Biophotonics* 9 (10) (2016) 1085–1097.
- E. Suharto, A. Yunanto, E. Hartoyo, N. Kania, A.A. Utama, R.K. Sari, N.A. Putri, I. Thalib, UV-visible spectrophotometric as a prospective tool in neonatal sepsis, *Indonesian Bio. J.* 10 (1) (2018) 74–78.
- C. Lichtenstem, C. Koch, R. Rohrig, B. Rosengarten, M. Henrich, M.A. Weigand, Near infrared spectroscopy in sepsis therapy: predictor of a low central venous oxygen saturation, *Anaesthesist* 61 (10) (2012) 83–91.
- K.E. Mulier, D.E. Skarda, J.H. Taylor, D.E. Myers, M.K. McGraw, B.L. Gallen, G.J. Bellman, Near-infrared spectroscopy in patients with severe sepsis: correlation with in vivo hemodynamic measurements, *Surg. Infect.* 9 (5) (2008) 515–519.
- N.I. Shapiro, R. Arnold, R. Sherwin, J. O'Connor, G. Najarr, S. Singh, D. Lundy, T. Nelson, S.W. Trzedeak, A.E. Jones, The association of near-infrared spectroscopy-derived tissue oxygenation measurements with sepsis syndromes, organ dysfunction and mortality in emergency department patients with sepsis, *Crit. Care* 15 (2011) R233.
- S. Roy, D. Perez-Guaita, S. Bowden, P. Heraud, B.R. Wood, Spectroscopy goes viral: diagnosis of hepatitis B and C virus infection from human sera using ATR-FTIR spectroscopy, *Clin. Spectrosc. S* 2666–0547 (20) (2020) 30001–30006.
- B. Elumalai, A. Prakasara, B. Ganesan, K. Dornadulab, S. Ganesana, Raman spectroscopic characterization of urine of normal and oral cancer subjects, *J. Raman Spectrosc.* 46 (1) (2014) 84–93.
- B. Elumalai, R. Rajasekaran, P. Aruna, D. Koteeswaran, S. Ganesan, High wavenumber Raman spectroscopy in the characterization of urinary metabolites of normal subjects, oral premalignant and malignant patients, *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 171 (2017) 52–59.
- M.J. Cameron, H.J. Butler, D.S. Palmer, M. Baker, Biofluid spectroscopic disease diagnostics: a review on the processes and spectral impact of drying, *J. Biophotonics* 11 (4) (2018) e201700299.
- U. Neugebauer, S. Trenkmann, T. Bocklitz, D. Schmerler, M. Kiehnopf, J. Popp, Fast differentiation of SIRS and sepsis from blood plasma of ICU patients using Raman spectroscopy, *J. Biophotonics* 7 (3–4) (2014) 232–240.
- A. Yunanto, A. Iskandar, A. Utama, N. Muhtaminah, E. Suharto, Early detection of neonatal sepsis using Fourier transformation infrared spectroscopy (FTIR), *AIP Conference Proceedings*, 20026, 2019 1–6.
- R. Gautam, M. Deobagkar-Lee, S. Majumdar, B. Chandrasekar, E. Victor, S. M. Ahmed, N. Wadhwa, T. Verma, S. Kumar, N.R. Sundaresan, S. Umapathy, D. Nandi, Molecular profiling of sepsis in mice using Fourier transform infrared microspectroscopy, *J. Biophotonics* 9 (1–2) (2016) 67–82.
- A.J. Batty, J. Li, X. Wang, W.E. Ackerman, S.G. Kirk, W.M. White, X. Wang, D. Anastakis, L. Samavati, I. Buhimshi, L.D. Nelin, M. Hafner, Y. Liu, Dysregulation of lipid metabolism during gram-negative sepsis in Mkp-1 deficient mice, *J. Immunol.* 202 (1) (2019) 187.
- K. Gajjar, J. Trevisan, G. Owens, P.J. Keating, N.J. Wood, H.F. Stringfellow, P.L. Martin-Hirsch, F.L. Martin, Fourier-transform infrared spectroscopy coupled with a classification machine for the analysis of blood plasma or serum: a novel diagnostic approach for ovarian cancer, *Analyst* 138 (2013) 3917–3926.
- M. Dimitrova, D. Ivanova, I. Karmancheva, A. Milev, L. Dobrev, Application of FTIR-spectroscopy for diagnosis of breast cancer tumors, *J. Univ. Chem. Technol. Metall.* (2009).
- M. Paraskavidi, C.L.M. Moraes, K.M.G. Lima, J.S. Snowden, J.A. Saxon, A. M. T. Richards, M. Jones, D.M.A. Mann, D. Allsop, P.L. Martin-Hirsch, F. L. Martin, Differential diagnosis of Alzheimer's disease using spectrochemical analysis of blood, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (38) (2017) E7929–7938.
- C.V. Araújo, V. Estado, E. Tibiriça, P.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, A.R. Silva, PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis, *Microvasc. Res.* 84 (2) (2012) 218–2.
- A. Oleszko, J. Hartwich, A. Wójtowicz, M. Gasiór-Gogowska, H. Hura, M. Komrowska, Comparison of FTIR-ATR and Raman spectroscopy in determination of VLDL triglycerides in blood serum with PLS regression, *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 5 (183) (2017) 239–246.
- K.V. Kornnev, Mouse models of sepsis and septic shock, *Mol. Biol. (Mosk)* 53 (5) (2019) 799–814.
- J.R.A. Araujo, O.J.M. Torre, N.G. Czecko, F.F. Tuon, P.A.N. Nassif, G.D. Souza, Procalcitonin as a prognostic biomarker of severe sepsis and septic shock, *Rev. Col. Bras. Cir.* [online] 39 (6) (2012) 456–461.
- H. Goldshtein, M.J. Hausmann, A. Douvdevani, A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids, *Ann. Clin. Biochem.* 46 (6) (2009) 488–494.
- K. Saukkonen, P. Laakkio, M. Varpula, T. Varpula, L.M. Voipio-Pulkki, V. Pettilä, K. Pulkki, Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients, *Intensive Care Med.* 33 (9) (2007) 1624–1627.
- P.J. Johnson, Y.M. Lo, Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease, *Clin. Chem.* 48 (8) (2002) 1186–1193.
- Y.M. Lo, T.H. Rainer, L.Y. Chan, N.M. Hjelm, R.A. Coombs, Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients, *Clin. Chem.* 46 (3) (2000) 319–323.
- M.V. Andreatta, V.M. Curty, J.V.S. Coutinho, M.A.A. Santos, P.F. Vassallo, N.F. de Sousa, V.G. Barauna, Cell-free DNA as an earlier predictor of exercise-induced performance decrement related to muscle damage, *Int. J. Sports Physiol. Perform.* 13 (7) (2018) 953–956.
- S.L. Hishia, D.R. McKenzie, N.J. Nosworthy, J.A. Denman, O.U. Sezerman, M.M.M. Bilek, The Vroman Effect: Competitive Protein Exchange With Dynamic Multilayer Protein Aggregates, 10, 2013, pp. 395–404 103.
- L.B. Leal, M.S. Nogueira, R.A. Ganevari, L.F.C.S. Carvalho, Vibrational spectroscopy and body biofluids: literature review for clinical applications, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 24 (2018) 237–244.
- L. Rieppo, S. Saarikkala, T. Nahli, H.J. Helminen, J.S. Jurvelin, J. Rieppo, Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage, *Osteoarthr. Cartil.* 20 (5) (2012) 452–459.
- A.B. Owen, Randomly permuted (t,m,s)-nets and (t,s)-sequences, in: H. Iederreiter, P.J.S. Shiu (Eds.), *Monte Carlo and Quasi-Monte Carlo Methods in Scientific Computing. Lecture Notes in Statistics*, 106, Springer, New York, 1995.

- [48] M.R. Whitbeck, Second Derivative Infrared Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 35 (1) (1981) 93–95.
- [49] R. Martín-Clemente, V. Zarzoso, LDA via L1-PCA of whitened data, *IEEE Trans. Signal Process.* 68 (2020) 225–240.
- [50] L.F.C.S. Carvalho, M.S. Nogueira, L.P.M. Neto, T.T. Bhatnagarjee, A.A. Martin, Raman spectral post-processing for oral tissue discrimination – a step for an automated diagnostic system, *Biomed. Opt. Express* 8 (11) (2017) 5218–5227.
- [51] Z. Movasaghi, S. Rehman, I. Rehman, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues, *Appl. Spectrosc. Rev.* 43 (2) (2008) 134–179.
- [52] L.B. Leal, M.S. Nogueira, J.G.A. Mageski, T.P. Martini, V.G. Barauna, L. dos Santos, L.F.C.S. Carvalho, Diagnosis of systemic diseases using infrared spectroscopy: detection of iron overload in plasma – preliminary study, *Biol. Trace Elem.* (2021), <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02510-3>.
- [53] I. Beil, G. Calado, A. Malkin, S. Flint, S. Galvin, C.M. Healy, M.L. Pimentel, H.J. Byrne, F.M. Lyng, A pilot study for early detection of oral premalignant diseases using oral cytology and Raman micro-spectroscopy: assessment of confounding factors, *J. Biophotonics* 13 (11) (2020) e202000079.
- [54] N. Agarwal, C.S. Pitchumoni, A.V. Sivaprasad, Evaluating test for acute pancreatitis, *Am. J. Gastroenterol.* 85 (1990) 356–366.
- [55] C.D. Angus, T. van der Poll, Severe Sepsis and Septic Shock, *N. Engl. J. Med.* 369 (9) (2013) 840–851.
- [56] J. Rello, F.V. Sanchez, M.R. Rodriguez, S. Moyano, Sepsis: a review of advances in management, *Adv. Ther.* 34 (11) (2017) 2393–2411.
- [57] M.M. Levy, A. Rhodes, G.S. Phillips, S.R. Townsend, C.A. Schorr, R. Beale, T. Osborn, S. Lemeshow, J.D. Chiche, A. Artigas, R.P. Dellinger, Surviving sepsis campaign: an association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study, *Crit. Care Med.* 43 (1) (2015) 3–12.
- [58] S.K. Andersen, J. Gjedsted, C. Christiansen, E. Tonnesen, The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis, *J. Leukoc. Biol. Suppl.* 75 (2004) 413–421.
- [59] A.C. Nogueira, V. Kawabata, P. Biselli, M.H. Lins, C. Valeri, M. Seckler, W. Hoshino, L.G. Junior, M.M. Bernik, J.B. de Andrade Machado, M.B. Martinez, P.A. Lotufo, E.G. Cakdini, E. Martins, R. Curi, F.G. Soriano, Changes in plasma free fatty acid levels in septic patients are associated with cardiac damage and reduction in heart rate variability, *Shock* 29 (3) (2018) 342–348.
- [60] J.L. Gallin, D. Kaye, W.M. O'Leary, Serum lipids in infection, *N. Engl. J. Med.* 281 (1969) 1081–1086.
- [61] I. Ilias, D.A. Vassiliadi, M. Theodorakopoulou, E. Boutati, E. Maratou, P. Mitrou, I. Dimopoulou, Adipose tissue lipolysis and circulating lipids in acute and subacute critical illness: effects of shock and treatment, *J. Crit. Care* 29 (6) (2014) 1130.
- [62] T. Riva, C. Cinq-Frais, S. Silva-Sifoneles, J. Garcia, B. Riu, R. Salvayre, S. Caspar-Bauguil, Alterations of plasma phospholipid fatty acid profile in patients with septic shock, *Biochemistry* 95 (11) (2013) 2177–2181.
- [63] J. Bai, J. Lin, H. Zhuang, D. Guo, X. Yang, M. Duan, [Changes in plasma cholesterol level and risk factors of death in patients with sepsis], *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 28 (2) (2016) 164–168.
- [64] I. Novak, Effective home programme intervention for adults: a systematic review, *Clin. Rehabil.* 25 (12) (2011) 1066–1085.
- [65] C.M. Tanner, F. Kamel, G.W. Ross, J.A. Hoppin, S.M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G.S. Bhudhikanok, M. Kasten, A.R. Chade, Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease, *Environ. Health Perspect.* 119 (2011) 866–872.
- [66] J.R. Hands, P. Abel, K. Ashton, T. Dawson, C. Davis, R.W. Lea, A.J. McIntosh, M.J. Baker, Investigating the rapid diagnosis of gliomas from serum samples using infrared spectroscopy and cytokerin and angiogenesis factors, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7347–7355.
- [67] J.M. Cameron, C.A. Jenkins, G. Hithell, S. Hume, N.T. Hunt, M.J. Baker, Shining a light on clinical spectroscopy: translation of diagnostic IR, 2D-IR and Raman spectroscopy towards the clinic, *Clin. Spec.* 1 (2019) 100003.
- [68] W.G. Ahon, J.S. Jung, D.K. Song, Lipidomic analysis of plasma lipids composition changes in septic mice, *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 22 (4) (2018) 399–408.
- [69] B. Sylas, S.B. Cappi, D.T. Noritomi, L.T. Velasco, R. Curi, T.C.A. Loureiro, F. G. Soriano, Dyslipidemia: a prospective controlled randomized trial of intensive glycemic control in sepsis, *Intensive Care Med.* 38 (2012) 634–641.
- [70] S. Roy, D. Perez-Guaita, D.W. Andrew, J.S. Richards, D. McNaughton, P. Heraud, B.R. Wood, Simultaneous ATR-FTIR based determination of malaria parasitemia, glucose and urea in whole blood dried onto a glass slide, *Anal. Chem.* 89 (10) (2017) 5238–5245.
- [71] H. Lin, Y. Zhang, Q. Wang, B. Li, S. Fan, Z. Wang, Species identification of bloodstains by ATR-FTIR spectroscopy: the effects of bloodstain age and the deposition environment, *Int. J. Legal Med.* 132 (3) (2018) 667–674.
- [72] L. Dong, X. Sun, Z. Chao, S. Zhang, J. Zheng, R. Gurung, J. Du, J. Shi, Y. Xu, Y. Zhang, J. Wu, Evaluation of FTIR spectroscopy as diagnostic tool for colorectal, *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 122 (2013) 288–294.
- [73] X. Wang, X. Shen, D. Sheng, X. Chen, X. Liu, FTIR spectroscopic comparison of serum from lung cancer patients and healthy persons, *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 122 (2014) 193–197.
- [74] H.J. Butler, P.M. Brennan, J.M. Cameron, D. Finlayson, M.G. Hegarty, M.D. Jenkinson, D.S. Palmer, B.R. Smith, M.J. Baker, Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer, *Nat. Commun.* 10 (2019) 4501.
- [75] J. Bujok, M. Gąsior-Głogowska, M. Marszałek, N. Trochanowska-Pauk, F. Zigo, A. Pavlak, M. Komorowska, T. Walski, Applicability of FTIR-ATR method to measure carbonyls in blood plasma after physical and mental stress, *Biomed. Res. Int.* 201 (2019) 2181370.

## 13 ANEXO IV

## 13. 1 TRABALHO ACEITO EM REVISTA EM CIENTÍFICA



International Journal of  
Molecular Sciences



Review

## Properties and Application of Cell-Free DNA as a Clinical Biomarker

Felipe Silva de Miranda <sup>1,2,3</sup>, Valério Garrone Barauna <sup>4,5,6</sup>, Leandro dos Santos <sup>7</sup>, Gustavo Costa <sup>6</sup>, Paula Frizzera Vassallo <sup>6,8</sup> and Luciene Cristina Gastalho Campos <sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Post Graduation Program in Biology and Biotechnology of Microorganisms, State University of Santa Cruz, Ilhéus, 45662-900, Bahia, Brazil; felipemiranda2004@hotmail.com (F.S.M.); lcgcluiz@uesc.br (L.C.G.C.)

<sup>2</sup> Department of Biological Science, State University of Santa Cruz, Ilhéus, 45662-900, Bahia, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Applied Pathology and Genetics, State University of Santa Cruz, Ilhéus, 45662-900, Bahia, Brazil

<sup>4</sup> Post Graduation Program in Health Sciences, State University of Santa Cruz, Ilhéus, 45662-900, Bahia, Brazil; barauna2@gmail.com (V.G.B.)

<sup>5</sup> Molecular Physiology Laboratory of Exercise Science, Federal University of Espírito Santo, Vitória, 29075-910, Espírito Santo, Brazil

<sup>6</sup> Post Graduation Program in Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, 29075-910, Espírito Santo, Brazil; gustavo\_ufes@hotmail.com (G.C.); pfvassallo@gmail.com (P.F.V.)

<sup>7</sup> Academic Unit of Serra Talhada, Rural Federal University of Pernambuco, Serra Talhada, 56909-535, Pernambuco, Brazil; leandro.santos.79@gmail.com (L.S.)

<sup>8</sup> Clinical Hospital, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

\* Correspondence: lcgcluiz@uesc.br; Tel.: +55-73-3680-5550 or +55-11-98696-0116

**Citation:** Miranda, F.S.; Barauna, V.G.; Santos, L.; Costa, G.; Vassallo, P.F.; Campos, L.C.G. Properties and Application of Cell-Free DNA as a Clinical Biomarker. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor:

Received: date

Accepted: date

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Biomarkers are valuable tools in clinical practice. In 2001, the National Institutes of Health (NIH) standardized the definition of a biomarker as a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacological responses to a therapeutic intervention. A biomarker has clinical relevance when it presents precision, standardization and reproducibility, suitability to the patient, straightforward interpretation by clinicians, and high sensitivity and/or specificity by the parameter it proposes to identify. Thus, serum biomarkers should have advantages related to the simplicity of the procedures and to the fact that venous blood collection is commonplace in clinical practice. We described the potentiality of cfDNA as a general clinical biomarker and focused on endothelial dysfunction. Circulating cell-free DNA (cfDNA) refers to extracellular DNA present in body fluid that may be derived from both normal and diseased cells. An increasing number of studies demonstrate the potential use of cfDNA as a noninvasive biomarker to determine physiologic and pathologic conditions. However, although still scarce, increasing evidence has been reported regarding using cfDNA in cardiovascular diseases. Here, we have reviewed the history of cfDNA, its source, molecular features, and release mechanism. We also show recent studies that have investigated cfDNA as a possible marker of endothelial damage in clinical settings. In the cardiovascular system, the studies are quite new, and although interesting, stronger evidence is still needed. However, some drawbacks in cfDNA methodologies should be overcome before its recommendation as a biomarker in the clinical setting.

**Keywords:** cfDNA; biomarker; endothelial dysfunction; vascular damage; circulating nucleotide

### 1. cfDNA – Historical Perspective

Circulating cell-free DNA (cfDNA) are extracellular fragments of DNA present in body fluid that may be derived from both normal and diseased cells [1]. cfDNA molecules were discovered in the human circulatory system in 1948 by Mandel and Metais [2]. Seventeen years later, in 1965, Bendich et al. [3] hypothesized that cancer-derived cfDNA was a determining factor in oncogenesis, specifically favoring the metastatic spread of cancer.

Certainly, due to a lack of knowledge regarding its composition, function, and biological and evolutionary origins, cfDNA did not receive significant attention for the next 55 years after its discovery. In 1966, the link to disease state was first noted when Tan et al. [4] identified high levels of cfDNA in the blood of systemic lupus erythematosus.

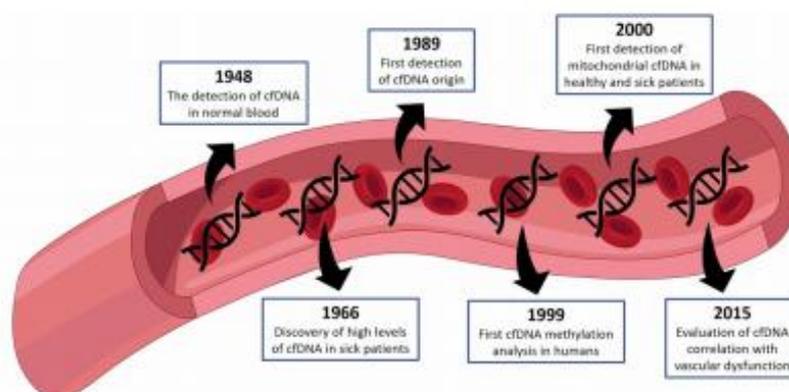
Ten years later, Leon et al. [5] demonstrated, through radio-immunochemistry assay, that cancer patients featured a higher level of cfDNA than normal subjects. Furthermore, cfDNA levels decreased with the anticancer therapy success. However, because of technological limitations, only 12 years later, in 1989, Stroun et al. [6] demonstrated the first experimental evidence that identified the origin of cfDNA in cancer patients. The authors observed the double-strand instability specific to the tumor DNA in the cfDNA, and thus, it became also to be called ctDNA (circulating-tumoral DNA).

The progress of molecular biology techniques in the 1990s associated with the human genome project development allowed a more direct demonstration of this tumor origin. In 1994, Vasioukhin et al. [7] and Sorenson et al. [8] showed tumor-specific (N-RAS) mutations in the plasma samples of patients with pancreatic adenocarcinoma and acute myelogenous leukemia. In parallel, other specific analyses of cfDNA had become of interest in a clinical domain. In 1997, Lo et al. [9] identified fetal cfDNA in maternal plasma and serum. These observations opened a range of opportunities suggesting maternal plasma/serum DNA as a useful source for noninvasive prenatal diagnosis of genetic disorders in obstetrics.

In the following years, new studies showed evidence of cfDNA methylation as an epigenetic biomarker. Simultaneously, in 1999, two groups performed for the first time the cfDNA methylation evaluation in humans. Esteller et al. [10] detected aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in cfDNA from non-small cell lung cancer patients, and Wong et al. [11] detected aberrant methylation of the p16 gene in the cfDNA of hepatocellular carcinoma patients. Both showed for the first time that the presence of aberrant promoter methylation could be detected in the peripheral circulation of cancer patients with hepatocellular carcinoma.

Although previous studies have shown that tumor-specific DNA and fetal DNA are present in plasma and serum from patients with cancer and pregnant women, the first evidence of mitochondrial cfDNA (mt-cfDNA) in plasma and serum was shown in 2000 by Zhong et al. [12]. At this moment, the nomenclature of cfDNA was used both for nuclear cfDNA (n-cfDNA) and mt-cfDNA, and each type of cfDNA showing different structures and functions. In Zhong's study, mt-cfDNA was detectable in plasma and serum samples from healthy subjects and patients with diabetes. Moreover, the authors also detected a mitochondrial mutation commonly found in patients with maternally inherited diabetes in both samples of patients with diabetes. Please see the recent review by Bronkhorst et al. [13] for more details about the different nomenclature.

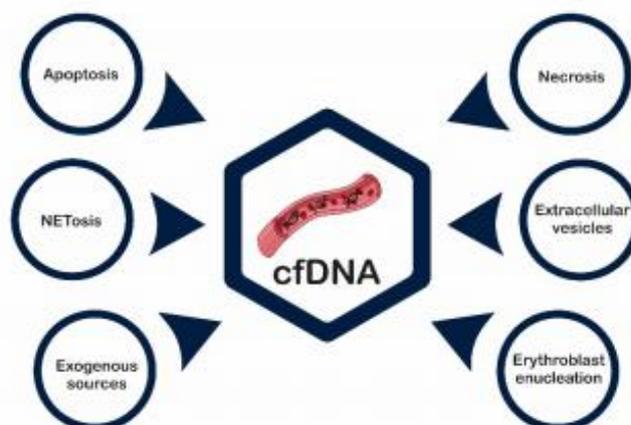
Lately, a growing number of publications show the scientific interest of cfDNA in clinical applications. Quantification of cfDNA concentration as a tool for noninvasive diagnosis and monitoring was performed in several acute and chronic disorders and different conditions like tissue damage, cell death, and turnover [14–19]. Figure 1 provides a timeline of the main discoveries concerning cfDNA.



**Figure 1.** Chronological summary of cfDNA. The timeline shows the main cfDNA discoveries, from the first report in 1948 until the first correlation of cfDNA with vascular dysfunction in 2015. cfDNA: circulating cell-free DNA.

## 2. cfDNA—Source and Mechanism of Release

cfDNA can be found in many body fluids, both in physiological conditions as well as in pathological disorders. Different mechanisms allow the release of DNA fragments from the intracellular to the extracellular compartment. In healthy and diseased (benign and malignant) individuals, the release processes of DNA into the human blood circulation can originate from: (1) necrosis, (2) apoptosis, (3) active DNA release, and (4) exogenous sources (Figure 2).



**Figure 2.** cfDNA sources. cfDNA is released into the human blood circulation by normal cells and cells involved with pathologic processes, including cell death. cfDNA: circulating cell-free DNA.

Necrosis is the premature death of cells caused by an injury. Noxious stimuli due to external factors, such as infections (bacteria, viruses, fungi, parasites), toxins, hypoxia, and extreme environmental conditions (heat, radiation, or ultraviolet irradiation), lead to irreversible injury of the tissue and cell death by necrosis. When cells die by necrosis, they exhibit nuclear chromatin dumping and nonspecific digestion patterns, organelle and cell swelling, plasma membrane disintegration, and other cellular components release [20,21]. Jahr et al. [22] proposed that longer cfDNA fragments (i.e., >10 kb) are often observed in

cancer patients, indicating an origin from necrosis. Many studies, had reported that fragments released from necrotic cells are often much larger than apoptotic DNA fragments because, despite necrosis occurs more rapidly than apoptosis, the removal of necrotic cells is slower [23–25]. In vitro assays, performed by Choi et al. [26], showed that the release of necrotic DNA fragments is phagocytic clearance dependent.

On the other hand, apoptosis is programmed cell death. There are a wide variety of stimuli and conditions, both physiological and pathological, that can trigger apoptosis. The mechanisms of apoptosis are complex involving an energy-dependent cascade of molecular events. The apoptotic cells exhibit cellular shrinkage and pyknosis followed by fragmentation of the nucleus. The cells are smaller in size, the cytoplasm is dense, and the organelles are more tightly packed. Every organelle integrity is still maintained, and all of this is enclosed within an intact plasma membrane [18,19,25]. Many studies suggest that the bulk of cfDNA found in healthy and diseased individuals is released during apoptosis [24]. A hallmark of apoptosis is chromosomal DNA degradation, in large fragments (50–300 kb) and subsequently into multiples of nucleosome units (180–200 bp) via caspase-activated DNase (CAD) [27–29]. This evidence was founded through a ladder pattern in electrophoresis assay. The separation of extracted cfDNA displays fragment ladders that ranged from ~160 to 1000 bp. The size of these fragments is due to multiple DNA lengths in nucleosomes and predominantly corresponds to mono- and oligonucleosomes. This feature is characteristic of caspase-dependent cleavage by the apoptosis pathway [22,30,31]. The presence of apoptotic cells is short-lived due to highly efficient phagocytic clearance mechanisms orchestrated by a series of intercellular events coordinated by a complex signaling network [25,29].

In addition to necrotic or apoptotic cell death, the active DNA release is described as another cfDNA release mechanism. Recent in vitro cell culture studies have demonstrated the presence of cfDNA in culture medium at levels that, which do not correlate with the processes of apoptosis, necrosis, or DNA replication. Wang et al. [32] assessed the release pattern of cfDNA from breast cancer cell lines. Interestingly, they showed the cfDNA concentration did not correlate with the amount of apoptotic and necrotic cells. However, if more cells were in the G1 phase, more cfDNA was detected. Aucamp et al. [33] evaluated characteristics of the cfDNA released by eight different cell lines and concluded its active release levels correlate cell line's growth rate and cancer status of the cell line through its dependence on glycolytic activity. Chen et al. [34] reported increases in the concentration of cfDNA derived from cancer cells cultured in vitro during cell proliferation, indicating that a significant fraction of cfDNA is derived from active cellular secretions. The authors assume that the release of this cfDNA into the blood could transfect and transform adjacent or distant normal cells. While the exact mechanisms involved in the active release of cfDNA remain unclear, cfDNA may be released because of genomic instability.

Genomic instability plays an essential role in DNA replication mechanisms, as demonstrated by Diamond et al. The authors identified that tumor-derived exosomes transfer DNA to dendritic cells and activate them [35]. This release occurred after DNA accumulation in the cytosol and was regulated by the expression of the three prime repair exonuclease 1 (TREX1) in the parent cells [36]. In this context, it is important to highlight the cytosolic compartment is virtually devoid of DNA in physiological conditions. However, several situations can increase levels of single and/or double-stranded DNA molecules as, for example, due to cell death pathways activation involving mtDNA release into the cytosol [37], mitotic defects [38], and genomic instability by exposure to DNA-damaging agents [36]. Furthermore, cytosolic DNA accumulation may happen by genetic defects affecting the expression or catalytic activity of nucleases involved in this cellular pathway [39]. In keeping with this, mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2A, and RNASEH2C can source cytosolic DNA accumulation [40].

In contrast to various forms of cell death, active DNA release occurs in viable cells. Currently, active DNA release may include NETs (neutrophil extracellular trap), exosomes, and erythroblast enucleation. NETs are networks of extracellular DNA associated

with histones, elastase, myeloperoxidase, antimicrobial peptides, and granule proteins that are involved in the direct attack and killing of pathogens [41,42]. NETs are an important defense mechanism against bacterial, viral, fungal, and parasitic infections [43]. However, recent evidence has suggested that NETs may have a role in noninfectious diseases, including systemic lupus erythematosus [44], atherosclerosis [45,46], endothelial cell damage [47], vasculitis [48], trauma [49], thrombosis [50], cancer [51], sepsis [52,53], and in the inflammatory response [41,54,55]. These situations are especially ones in which high levels of cfDNA have been reported. Other studies also observed high levels of NETs after intense physical exercise and, consequently, high levels of cfDNA in the bloodstream [56,57].

NETs are formed via a novel type of active cell death called as NETosis (pathogen-induced cell death, including the release of NETs). NETosis is a dynamic process that results in the release of DNA from neutrophils in two forms: suicidal and vital NETosis. Although the "osis" term indicates the cell death after NETs release, in some cases, NETosis can induce a rapid and vital form to release NETs, in which the neutrophils can still perform their phagocytic functions [58,59].

The suicidal NETosis is a cell death program that occurs when pathogen agents activate neutrophils. This process leads to chromatin decondensation, cell and nuclear membranes lysis, and finally, the release of NETs [42,43]. Of note, suicidal NETosis can take hours, even with high levels of antigen stimulation. On the other hand, the vital NETosis allows NET release through the blebbing of the nucleus, resulting in a DNA-filled vesicle that is exocytosed, leaving the plasma membrane intact without neutrophil death. Vital NETosis involves vesicular trafficking of DNA from within the nucleus to the extracellular space, contributing to cfDNA in circulation [60]. These anuclear cytoplasts formed that is capable of tracking and engulfing living bacteria. Its rapid formation and release can be completed in a matter of minutes [59].

Although NETosis was first described in neutrophils, similar processes have been described in other immune cells, including eosinophils, monocytes, and B cells, mast cells, basophils, and macrophages [55], which are collectively referred to as "ETosis".

Another form of active release of cfDNA includes DNA fragments associated with extracellular vesicles, such as exosomes and microvesicles [1]. Although the release of apoptotic bodies during apoptosis has been long known [61], the fact that also perfectly healthy cells shed vesicles from their plasma membrane has only recently become appreciated [62,63].

Exosomes are intraluminal microvesicles that fuse with the plasma membrane and can be secreted by cells. Recently, Raposo et al. [64] reviewed exosome biogenesis. This cellular process begins with the invagination of the cellular plasma membrane, creating an early endosome. Then the invagination of the plasma membrane of the early endosome produces a multivesicular body with cytosolic cellular components. The exosome is represented by small vesicles of different sizes into the multivesicular body and is released occurs by fusion multivesicular endosome with the plasma membrane. Another multivesicular endosome may fuse with lysosomes. The point of divergence between these types of multivesicular endosomes is drawn at early endosomes, but the existence of distinct early endosomes feeding into these two pathways cannot be excluded. The mechanism for intercellular communication involves the intercellular transfer of extracellular vesicles. Deficiencies in our knowledge of the molecular mechanisms for extracellular vesicle formation and lack of methods to interfere with the packaging of cargo or with vesicle release, however, still hamper identification of their physiological relevance in vivo.

The exosomes can be composed of proteins, lipids, mRNA, microRNA, or cfDNA [65–67]. The cfDNA are carried both on the surface and in the lumen [68] of the microvesicles measuring 30–100 nm [66,69]. Zocco et al. [70] and Lázaro-Ibáñez et al. [71] identified that most of the DNA associated with extracellular vesicles was located on the outside or surface of these extracellular vesicles. The content of the DNA of extracellular vesicles is quite diverse and heterogeneous, which would demonstrate vesicle subpopulations with

different origins [71]. Recently, it has been demonstrated that microvesicles have functional and biological properties related to cellular communication, lateral transfer of material, immune system modulation, and cellular homeostasis maintenance [65,72,73].

An additional mechanism of active DNA release includes the nuclei expulsion from erythroblasts. Mature erythrocytes do not contain nuclei to optimize the unique function of ensuring proper oxygen delivery to the tissues [74]. Erythroblast enucleation is a stage of complex erythrocytes maturation process to produce a highly functional specialized cell [75]. At the end of erythroid precursors differentiation, among the changes occurring in this stage, cell cycle arrest, chromatin condensation, and nuclear polarization are essential for enucleation [76–78]. Then, erythroblasts lose all their organelles and expel their nuclei due to a process dependent on adhesion protein reorganization across the plasma membrane and macrophage interactions [79,80]. Kawane et al. [81] proposed that DNase II from macrophage lysosomes is responsible for DNA digestion and nuclei expulsion of precursor erythroid cells. Therefore, erythroblast enucleation serves primarily as a source of cfDNA in the bloodstream. LAM et al. [82] demonstrated that hematopoietic cells could contribute significantly to cfDNA origin. This cfDNA release has been directly associated with the increased erythropoietic activity of the bone marrow.

Additionally, cfDNA can also be released by exogenous sources. There is evidence that beyond the endogenous sources, foreign cfDNA from exogenous sources can be released into the bloodstream [83–89]. While endogenous cfDNAs originate from the cells of the organism of itself, exogenous cfDNAs are generally come from the host-microbiome [90], from different infectious agents (bacterial and viral) [91,92] and infestations (parasites) [86], as well as from the ingested food of the host organism [85]. Moreover, fetal cfDNA released into the maternal circulation [93] and cfDNA from organ transplantation [94] should also be considered.

### 3. cfDNA—Molecular Features

The pathophysiological importance of cfDNA is also related to its molecular characteristics. The cfDNA integrity (size) and its genetic and epigenetic profile and plasma concentration depend on its release mechanisms [30,95,96]. Furthermore, cfDNA includes n-cfDNA (nuclear) or mt-cfDNA (mitochondrial), with both types exhibiting different structural characteristics that potentially reveal different forms of biological stability [97]. The n-cfDNA are fragments of coding or non-coding genomic DNA. Among the coding and non-coding, n-cfDNA investigated, the housekeeping genes and tissue-specific genes have been used to study coding n-cfDNA. Repetitive sequences such as ALU (a short-interspersed nucleic element) and long-interspersed nucleotide elements (LINE1) have been used to explore the non-coding n-cfDNA. Both ALU and LINE1 sequences are distributed throughout the genome. In recent years, both n-cfDNA and mt-cfDNA have been used to examine mutations, methylation, copy-number variations (CNVs), cfDNA composition, and cfDNA fragmentation [98–102].

Some molecular biology techniques have been used to analyze cfDNA from plasma samples, including fluorescence [15], polymerase chain reaction (PCR) [9,14], quantitative real-time PCR (RT-qPCR) [16,103–111], droplet digital PCR (ddPCR) [88,112–117], array [112,118] and sequencing [87,106–108,114,118–128]. cfDNA also can be converted by bisulfite or digested with methylation-sensitive restriction enzyme (MSRE) for methylation analysis. The choice of the method depends on the different purposes of cfDNA detection and what molecular features will be analyzed. Fluorescence and conventional PCR are outdated techniques for analyzing cfDNA. Current PCR-based approaches have a lower cost, are easier to perform. However, there are a limited number of genes to be analyzed at a time. These need to be predetermined and eventually have less sensitivity. The array methodology allows the representation of the methylation status of cfDNA, identification of single nucleotide polymorphism (SNP) or CNVs, and search specific regions of interest. Sequencing-based approaches are more flexible, can be used for wide genomic analysis, and detect unknown mutations in specific genes. Despite the high cost, sequencing-based

approaches are becoming a more available option [129–133]. Altogether, all of these cfDNA analysis leads to a final problem: a lack of an absolute and precise quantity of cfDNA that could be widely used as a reference value for routine clinical diagnosis. Although most of the studies report different amounts of cfDNA between the disease situation versus the control condition, there is still a huge variability among laboratories. The authors refer the reader to previous publications for information about pre-analytical recommendations towards an international guideline for cfDNA analyses [134,135]. The several molecular features of cfDNA will be addressed below.

### 3.1. cfDNA Integrity

cfDNA integrity can be evaluated by its fragmentation level. High- and low-weight cfDNA molecules can be detected in different fluids. The differences in cfDNA fragments size can indicate their origin or their pathophysiological conditions on the body. Apoptotic cells produce DNA fragments of 180–200 base pairs (bp), whereas necrotic cells release higher molecular-weight DNA fragments of over 10 kbp in size [25,29,136].

The most common size of cfDNA found is ~166 bp and consists of a histone-complexed DNA, called nucleosome [137,138]. This is the main cfDNA size found in plasma from all kinds of health or disease subjects [30,139,141]. In healthy individuals, the cfDNA size has been described to vary mainly between 70 to 200 bp [142–144]. Evaluating the fetal cfDNA size, Chan et al. [145] identified that only 20% of plasma samples had fetal cfDNA fragments larger than 193 bp, while none fragments were above 313 bp. These fragments are shorter than maternal cfDNA, which has a maximum value of 798 bp. Moulriere et al. have shown that tumor-derived cfDNA is highly fragmented and mainly composed of fragments <145 bp [146].

### 3.2. Genetic and Epigenetic Profile

cfDNA released on biological fluids contains the same genetic and epigenetic variations as nuclear and mitochondrial DNA from viable cells. These changes may include copy-number variations (CNVs) [147,148], mutations [147,149], cfDNA composition [90] and methylation changes [150]. Thus, through the analyses of cfDNA is also possible to study the genetic profile of a patient.

### 3.3. Copy-Number Variations (CNVs)

CNVs are an important class of mutation contributing significantly to genome instability in several pathologies [151–153]. Large-scale genome studies have identified cfDNA CNVs across various types of cancer and demonstrated their potential as cancer biomarkers [154]. Li et al. demonstrated that CNVs might provide a measurable classifier for assessing clinical outcomes in advanced colorectal cancer patients [155]. Xia et al. performed whole-genome sequencing of urine in prostate cancer patients [156]. CNVs analysis detected genomic abnormalities, including AR amplification, TMPRSS2-ERG fusion, PTEN gene deletion, NOTCH1 locus amplification along with genomic amplifications in specific regions of the chromosomes 8, 9, 11, and 14, and deletions in specific regions of the chromosomes 4, 5, 7, 12, and 16. In addition, the study demonstrated the potential clinical utility of urine cfDNAs in predicting treatment response and monitoring disease progression. Kutilin et al. analyzed CNVs for 30 genes in patients with lung cancer [157]. CNVs were detected for genes responsible for apoptosis regulation (BAX, P53, and CASP3), proliferation (SOX2), DNA repair (XRCC1), oxidative phosphorylation (HV2), EGFR signaling pathway (GRB2, SOS1, MAPK1, STAT1, and BRAF), and for mir3678. These data made it possible to detect new molecular genetic markers for predicting metastases in the lung and greater knowledge for tumor resistance to target therapy.

### 3.4. Mutations

Mutation is a permanent alteration of the nucleotide sequence that makes up a gene. Mutations range in size and can affect anywhere from a single DNA base pair to a large segment of a chromosome that includes multiple genes. The mutation analysis of cfDNA in specific genes as KRAS, TP53, BRAF, epidermal growth factor receptor (EGFR), and adenomatous polyposis coli (APC) has been demonstrated great clinical relevance [158–163]. Once the mutation is detected in cfDNA, it enables noninvasive tumor diagnosis, suggested that blood cfDNA may be a promising tool in cancer screening with higher sensitivity and specificity [29,164,165]. Min et al. confirmed that the KRAS mutation identified from the colorectal cancer tumor tissue samples was consistently detected in the plasma cfDNA [166]. In addition, as several therapeutic agents in clinical trials target specific pathways, the identification of the mutation can provide the status of the patient's tumor to predict response to treatment.

### 3.5. cfDNA Composition

Changes in the physiological state of the organism can also be identified throughout the nucleic acid composition of the cfDNA. Natalya Veiko's group [167,168] showed that diseases could cause either GC-enrichment of the cfDNA pool or its oxidation. Their data showed cfDNA was GC-enriched in cases of atherosclerosis, heart attack, and rheumatic arthritis [169–171], while in cancer, the cfDNA was both GC-enriched and oxidized [168,172,173]. One of the main reasons for apoptotic cell death in oxidative stress is reflected by an increase in the oxidative modification of cellular DNA. When the DNA is released into circulation, it continues to bear these marks of oxidative stress, particularly increased levels of 8-oxo-dG, an oxidation marker [168].

Sergeeva et al. [96] demonstrated the effect of a GC-rich cfDNA or oxidized cfDNA as a stress signal for the cell signaling pathways. cfDNA GC-rich simultaneously activated NRF2/KEAP1 and NF- $\kappa$ B signaling pathways and increased gene expression of MAP3K1, MAP4K4, NF- $\kappa$ B1A, REL, I $\kappa$ BKB, RelA, NRFKB, NF- $\kappa$ B1, and NF- $\kappa$ B2.

Increased content of CG in cfDNA is recognized by cells. Ermakov et al. demonstrated that cfDNA GC-rich is a potent stimulatory effect on human peripheral blood lymphocytes [174]. Kostyuk et al. reported the activation of the signaling pathway depends on TLR9 and consequently causes the positive regulation of TLR9 and MyD88 expression [175]. Thus, the composition of cfDNA can significantly influence cellular functional activity.

### 3.6. Epigenetic

Changes in cfDNA epigenetic modifications may also suggest a disbalance on the body. Epigenetic modifications are heritable molecular events that affect gene expression without changing DNA sequences, including DNA methylation and histone modification. DNA methylation refers to the addition of methyl group to cytosine residues in DNA sequence, and it is the best-studied epigenetic event [176,177]. DNA methylation is essential for normal cellular development and plays an important role in epigenetic control of gene activity.

Simultaneously, two groups performed for the first time cfDNA methylation evaluation in humans. On one side, Esteller et al. detected aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in cfDNA from non-small cell lung cancer patients, while Wong et al. detected aberrant methylation of the p16 gene in the plasma and serum of hepatocellular carcinoma patients [10,11]. Both showed for the first time that cfDNA with aberrant promoter methylation could be detected in peripheral circulation cancer patients.

Different methylation patterns at CpG sites can be used to identify the cfDNA origin tissue. One limitation of total cfDNA quantifications is in non-identification of the tissue origin. Assays with appropriate target genes and their epigenetic signature have been one of the main factors to achieving relevant and accurate clinical effects [145,178].

Moss et al. developed an approach for unbiased determination of the tissue origins of cfDNA using a reference methylation atlas of 25 human tissues and cell types [178]. The authors identified that plasma cfDNA from healthy subjects originates mainly from hematopoietic cells (32%), erythrocyte progenitor cells (30%), lymphocytes (12%), monocytes (11%), vascular endothelial cells (9%), and hepatocytes (1%). Taken together, Moss et al. provided a detailed description of the composition of cfDNA in healthy people and proposed a new platform easily adapted to study the cellular contributors to cfDNA in many settings in healthy and pathologic human tissue dynamics.

### 3.7. cfDNA Concentration

The elevated level of cfDNA can reflect a physiological process, e.g., physical exercise [179–181] and pregnant women [182] or pathological processes, such as inflammation, diabetes, tissue trauma, sepsis, myocardial infarction, and patients that received transplantations [14,88,144,182–187].

The total cfDNA level in cancer patients has a significant increase with a wide range (hundreds to thousands ng/mL in the blood) compared with the healthy controls (a relative level of 30 ng/mL and ranging between 0 and 100 ng/mL) [137,144]. Leng et al. reported the concentration of cfDNA in patients with non-small cell lung cancer was higher than in healthy controls [188]. Zill et al. performed analyses of cfDNA sequencing data of patients with late-stage cancers across >50 cancer types. They showed a marked variation in blood cfDNA levels among patients with different tumor types [189]. Bettegowda et al. described lower amounts of cfDNA in patients with benign lesions or with early-stage cancer compared to patients with advanced or metastatic tumors [106]. This finding suggested that level of cfDNA can be changed according to the stages of the disease. Prakash et al. have been reported significant differences in the concentration of cfDNA during a perioperative process in donors and recipients undergoing living donor liver transplantation [190].

Finally, the concentration of cfDNA has been reporting as a potential predictor for clinical outcome in patients with ovarian and lung cancer [191,192]. Therefore, patients with high baseline cfDNA concentration had a significantly worse disease and overall survival than those with lower concentrations.

### 3.8. mt-cfDNA

mt-cfDNA has been found in healthy subjects and patients with breast cancer and acute ischemic stroke [193,194]. Mt-cfDNA can also be released into blood circulation by mechanisms of apoptosis, necrosis, and active cellular secretion, as discussed above. Mt-cfDNA has been shown to be more fragmented than n-cfDNA, typically ranging between 30 and 80 bp with peaks in 42–60 bp [193,195]. This smaller size can be ascribed to the absence of nucleosome-associated histone proteins, which render mt-cfDNA exposed to enzymatic cleavage [195,196].

Although the first evidence of cfDNA in the bloodstream was identified in 1948, only 52 years later, Zhong et al. [12] reported the presence of mt-cfDNA in plasma and serum samples. In their study, mt-cfDNA was detectable in healthy and diabetic patients. Moreover, the authors also describe a mitochondrial mutation commonly found in patients with maternally inherited diabetes. Jiang et al. showed elevated amounts of mt-cfDNA in hepatocellular carcinoma patients [30]. Mehra et al. demonstrated that mt-cfDNA levels do not always correlate with n-cfDNA levels [95]. The averages quantification of mt-cfDNA was higher than n-cfDNA levels, providing potentially distinct information with different sensitivity levels. Furthermore, Pinti et al. reported the copies number of mt-cfDNA increase significantly after the fifth decade of life, reaching its maximum value in the ninth decade [97]. This increase has been associated with the elevation of several pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-6, RANTES, and IL-1ra. Due to its unique characteristics, such as small size, simple characterization by sequencing, and greater

abundance, the mt-cfDNA can be used as a more sensitive diagnostic tool than n-cfDNA [88,197]. Moreover, Ingelsson et al. and Itagaki et al. reported other functions for mt-cfDNA. Lymphocytes, monocytes, and neutrophils can rapidly eject mtDNA, as network filament structures perform an important role in antimicrobial defense [198,199].

#### 4. Clinical Findings

In the last years, cfDNA both in plasma or serum has been studied as a potential biomarker and noninvasive screening tool for many diseases, especially solid tumors and fetal genetic abnormalities.

In 1965, Bendich and colleagues [3] showed that cfDNA derived from neoplastic cells could be involved in metastases. Almost ten years later, it was demonstrated by the radioimmunoassay technique that half of the cancer patients had significantly higher levels of cfDNA compared to controls [5]. In addition, in the early 1970s, cfDNA was described in patients with autoimmune disease [4]. As previously mentioned, all these observations have highlighted the interest in its potential as a noninvasive prognostic and diagnostic biomarker for various diseases.

The development of new molecular techniques allowed the reproducible detection and identification of low levels of cfDNA from a background mixture signal, permitting the detection in other physiological conditions, most successfully the fetal-derived cfDNA during pregnancy [119], myocardial infarction [15], stroke severity [16] and also as a minimally invasive screening tool for many diseases, especially solid tumors and fetal genetic abnormalities.

One of the most significant discoveries for applying cfDNA was identifying fetal cfDNA in maternal blood [9], which enabled developing genetic tests in prenatal care. The origin of the fetal cfDNA found in maternal blood has been described from the placenta, fetal hematopoietic cells, and the fetus [103,104].

A multicenter study in the USA for prenatal screening for fetal aneuploidy tests using cfDNA had a lower false-positive rate in detecting trisomy 21 and 18, compared to the standard procedure [106]. Currently, the use of cfDNA is well established for fetal sex assessment, paternity testing, and detection of aneuploidies and trisomies [119–121], diagnosis of monogenic diseases [112,122], fetal sex determination for sex-linked disorders [118], and fetal RhD status [105]. The proportion of fetal cfDNA represents only a minor fraction of the total amount of cfDNA (3–25%) [123], and this concentration increase with gestational age, with a potential association with body mass index [88] and being better detected around the ten weeks of pregnancy [124].

Advances in eliminating the maternal background DNA and increasing the sensitivity to detect small concentrations of fetal cfDNA were achieved in techniques related to DNA isolation, single-molecule amplification, and high-throughput sequencing, improving the accuracy and robustness of noninvasive prenatal testing for fetal cfDNA. Nowadays, fetal cfDNA is already used for clinical screening in fetal genetic abnormalities in high-risk pregnancies. Since 2011, cfDNA noninvasive prenatal tests have been commercially available to determine paternity, fetal sex and to identify abnormalities in chromosomes, especially for detecting the most prevalent chromosomal aneuploidies, such as Down syndrome [200,201].

Another area of huge interest is studying cfDNA in oncology, with many findings reporting an association between cfDNA and cancer. In 1977, Leon et al. reported a significantly elevated serum DNA level in cancer, demonstrating that the serum of cancer patients contains higher concentrations of cfDNA than those of healthy individuals [5]. However, the importance of cfDNA in clinical cancer research was recognized in 1994, when point mutations of the N-RAS gene were identified in cfDNA of patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome [7]. The U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved in 2016 the first liquid biopsy test for commercial use. This diagnostic test detects deletions in exon 19 and substitution mutations of exon 21 in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene to identify patients with metastatic non-

small cell lung cancer (NSCLC) who would be eligible for treatment with erlotinib [202]. In 2020 FDA approved the first liquid biopsy NGS diagnostic tests for commercial use. These diagnostic tests identify mutations in different genes in patients eligible for specific treatments, including patients with breast cancer, NSCLC, and prostate cancer. The full list of approved nucleic acid tests, including cfDNA tests, can be viewed on the FDA website [203].

The fragment size and/or variations in the genetic abnormalities from circulating cfDNA can be identified and differentiated from normal cells, representing up to 1% of the total cfDNA [204]. Notably, cfDNA can also be detected in other biological materials, such as stool, urine, saliva, pleural fluid, and cerebrospinal fluid [205]. Several studies [204–207] described that liquid biopsy is cheaper and less invasive to the patient, establishing this test as a method to detect a tumor before the onset of clinical symptoms and identify drug resistance through the quantification of cfDNA.

Today, the potential of cfDNA is validated by many clinical studies [205,206,208], and recent publications have pointed technical advances in analyses and sequencing that have led to dramatic improvements to differentiation of cfDNA targets, such as mutations in tumor-suppressor genes, activated oncogenes, hypermethylation, or chromosomal disorders [209], thereby increasing the clinical utility of cfDNA as an oncogenic marker. This provides deeper insights into tumor development and response to different treatments in the face of cancer evolution.

The levels of cfDNA in the circulation of cancer patients have been related to disease stage, varying the percentage in localized tumors to metastatic tumors [106], to tumor burden, and to the aggressiveness potential of the disease [107]. Of interest, in clinical screening and follow-up, cfDNA was detected in early-stage cancers (breast, colorectal, lung, and ovarian) associated with disease progression and survival of cancer patients [108].

Recent publications describe the release of cfDNA in different types of cancer. In ovarian cancer, for example, there are considerably increased levels of cfDNA in diagnosed patients than in healthy individuals or in patients with benign ovarian diseases, with significantly decreased after surgery [210]. The same happens in breast cancer, prostate cancer, stomach cancer, lung cancer, and others [208]; in all, high cfDNA levels were significantly associated with a higher tumor stage, which was correlated with worse survival. Besides the cfDNA concentration in plasma or serum, researchers also studied the methylation status of cfDNA in patients with hepatocellular carcinoma that may be involved in the inactivation of tumor suppressor genes [125]. It is clear to conclude that cfDNA has the potential to be considered as a biomarker of diagnosis and prognosis in cancer diagnosis, evidencing the potential to detect mutation and cellular abnormalities.

Since the discovery of donor-derived cfDNA (ddcfDNA) in organ recipients, by detecting Y-chromosome genes in the blood of sex-mismatched transplant recipients, the potential of ddcfDNA has been discussed as a cost-effective marker of rejection or as an indication of the health of the graft [14,109,110,113].

Interestingly, since ddcfDNA is a nonspecific organ or disease biomarker, it could be considered as a universal marker applicable for clinical monitoring of tissue injury in heart, lung, liver, and kidney allografts [14].

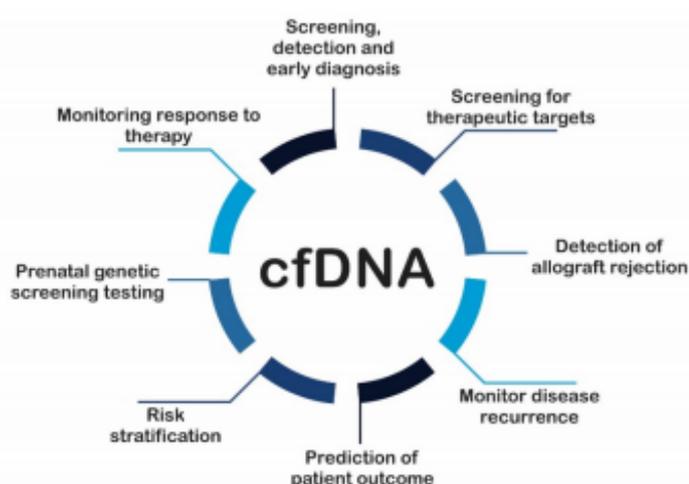
Publications reported [87,114], in heart transplantation, a percentage of ddcfDNA less than 1% at stable patients and increased up to 5% during a rejection episode. The same was observed in lung and renal transplantation [87,115]. In liver transplantation, a reduction of ddcfDNA was observed rapidly after ten days post-transplant, which remained stable in the absence of rejection. The level of ddcfDNA has been detached as a general biomarker of organ integrity, the severity of rejection [111,126], and as an early marker of rejection. The increased levels of ddcfDNA are associated with cellular rejection, as already seen in heart transplant [114], liver transplant [113], renal transplant [110], and lung transplant [87], while your rapid reduction post-transplant is considered a good prognostic indicator in grafts [209]. In the context of a bone marrow transplant, few

studies report the relation of release ddcfDNA with cancer relapses and graft versus host disease [127].

Recently, Schütz et al. [116] studies showed that the ddcfDNA in blood samples increased on the first day of the transplant, associated with an ischemia and reperfusion injury, gradually decreasing to a relatively stable level, moreover, was observed relation between ddcfDNA and liver function, showing that ddcfDNA can have the same sensitivity to reflect graft damage. In renal transplant, the increased ddcfDNA in blood samples could discriminate active rejection from non-rejection, validating using ddcfDNA in the blood as an accurate marker of kidney injury/rejection [128]. Interestingly, ddcfDNA was found to be elevated up to 5 months before the biopsy-proven rejection event, suggesting a potential role in a heart transplant [126].

Another application of ddcfDNA has been the monitoring of drug immunosuppression dose effective to avoid toxicity and dose adjustment. In one study, the lower blood concentrations of ddcfDNA levels from liver transplant patients were associated with higher tacrolimus concentrations [117]. Kanzow et al. observed that the adjustment of tacrolimus dose from subtherapeutic to therapeutic levels was associated with a significant decrease in serum ddcfDNA fractions [211].

CfDNA has already had a huge impact on prenatal medicine and could become, soon, an excellent tool in oncology, transplant medicine and also in conditions like cardiovascular diseases and sepsis. It is known that further studies should be conducted to understand the real role of cfDNA (Figure 3).



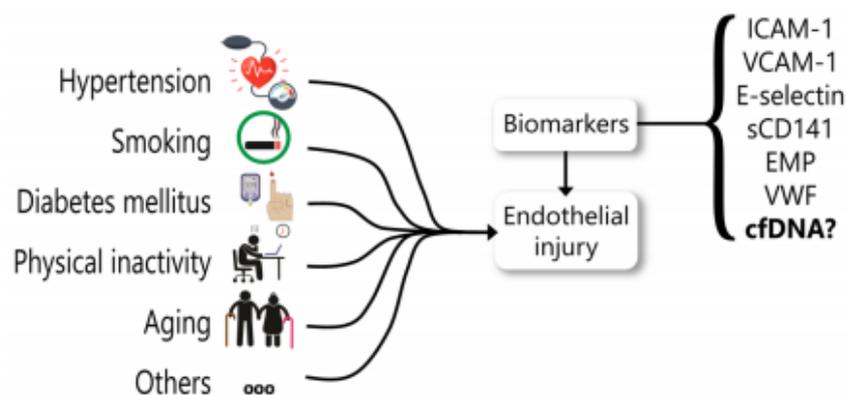
**Figure 3.** Potential clinical applications of cfDNA analysis. cfDNA can increase under abnormal conditions thus can be used as noninvasive biomarkers in several diseases and stages. cfDNA: circulating cell-free DNA.

### 5. cfDNA as a Biomarker for Endothelial Dysfunction

Blood vessels are structurally divided into three layers from the most internal to the most external: intima tunica, media tunica, and tunica adventitia. The intima tunica, also called endothelial layer (or endothelium), is basically composed of (i) endothelial cells, which are in direct contact with the blood, and (ii) the basement membrane, the layer that supports the endothelial cells [212].

Initially, the endothelium was considered as a passive barrier between blood and the other vascular layers. Far beyond this concept, it has been described that the endothelium also plays a fundamental role in body homeostasis, being recognized as an important autocrine, paracrine, and endocrine organ [213,214]. Thus, endothelial injury is the bridge

between risk factors and their consequences, such as infarction and stroke. Therefore, the search for biomarkers of endothelial dysfunction is extremely important (Figure 4).



**Figure 4.** Circulating biomarkers proposed for endothelial dysfunction. Endothelial injury may be due to many conditions, including hypertension, diabetes mellitus, smoking, physical inactivity, aging, among others several clinical complications. Biomarkers are a valuable tool in clinical research and medical practice to identify an endothelial injury. ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1; EMP: endothelial microparticles; VWF: von Willebrand factor; cfDNA: circulating cell-free DNA.

Biomarkers of endothelial injury are valuable tools in clinical practice. Circulating biomarkers of endothelial injury have the advantage related to the simplicity of the procedures and to the fact that venous blood collection is commonplace in clinical practice. Endothelial dysfunction biomarkers have already been reviewed elsewhere [215]. Adhesion molecules, such as E-selectin, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), as well as other molecules involved in the coagulation pathway, such as von Willebrand factor (vWF) and soluble thrombomodulin (sCD141), are among the most studied [216].

The first study linking cfDNA and vascular dysfunction dates from 2015 [17]. McCarthy et al. hypothesized that the mt-cfDNA was elevated in hypertension, activating Toll-like receptor-9 (TLR9) and leading to endothelial dysfunction. Using spontaneous hypertensive rats (SHR), the authors first showed elevated levels of mt-cfDNA in male SHR, but not in female animals. Wistar Kyoto normotensive rats had increased systolic blood pressure within three days of i.p. injection of mt-cfDNA, but not with n-cfDNA. No changes in body mass, total heart mass, left ventricular mass, right ventricular mass, or spleen mass was reported. Regarding vascular dysfunction, mesenteric resistance arteries from mt-cfDNA-treated rats were less sensitive to acetylcholine (an endothelium-dependent vasodilator), but no difference was observed in the relaxation with the endothelium-independent vasodilator (the nitric oxide-donor, sodium nitroprusside). These effects were reversed by blocking the TLR9, thus demonstrating the involvement of the mt-cfDNA and the innate immune system pattern recognition receptor TLR9 in the pathogenesis of hypertension and endothelial dysfunction.

Coscas et al. in 2017 [217] studied the role of cfDNA in the initiation of vascular calcification. DNA structure is an important source of phosphates, and the poly-anionic nature of cfDNA may cause it to strongly interact with cationic calcium phosphate. Using human aorta samples that displayed early stages of atheroma, the authors identified

cfDNA as a potential bed for calcium phosphate precipitation and hydroxyapatite crystallization through colocalization of cfDNA with sites of calcification. In addition, using the rat model of vascular calcification (intra-aortic infusions of cfDNA and elastase), the author observed that cfDNA was able to penetrate into the arterial wall and induce vascular wall calcification. The authors conclude that cfDNA could represent one type of mechanism able to initiate calcium phosphate precipitation and calcium phosphate apatite crystal formation. However, this mechanism does not exclude other possible processes, such as those involving microvesicle formation by injured cells [218].

Also, in 2017, Paunel-Gorgulu et al. [219] studied the role of cfDNA as an endothelial damage marker in patients after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB). cfDNA levels were measured in the patient's plasma at the time of admission and after surgery. Plasma cfDNA levels strongly increased after surgery in patients undergoing cardiac surgery both with short-time CPB (<100 min) or long-time CPB (>100 min). Although this initial increase was similar between groups, cfDNA levels remained significantly elevated until day 5 only in the long-time CPB (>100 min) patients. In addition, real-time PCR analyses revealed that mtDNA levels were significantly increased only in patients with long-time CPB (>100 min), indicating a more severe disease and more prone to systemic inflammation. In this study, the authors also measured sCD141 (soluble thrombomodulin) and ICAM-1 as molecular markers of endothelial cell injury. Both sCD141 and ICAM-1 levels were higher in patients with long-time CPB (>100 min). However, only sCD141 levels positively correlated with cfDNA levels.

The authors concluded that cfDNA represents an early biomarker for CPB-induced inflammation and a potential mediator of endothelial damage after cardiac surgery with prolonged bypass duration. The study also supported that cfDNA may potentialize inflammation, amplifying NETosis by an independent mechanism of endosomal TLR9 and ROS.

Recently, Yang et al. [220] proposed a blood test based on cfDNA that can predict the likelihood of a diabetes patient developing a microvascular complication. The author investigated the hydroxymethylation profile on cfDNA from patients with developed vascular complications versus those who did not yet manifest signs of vascular complications. cfDNA from 62 patients were sequenced, and for each gene, the extent of hydroxymethylation between patients with vascular complications and patients without was matched. This comparison showed almost 135 genes implicated in insulin resistance or inflammation with significantly different patterns of hydroxymethylation between groups. Among these genes, a specific selection of a 16-gene detection model showed superiority over commonly used clinical variables, including diabetic duration, body mass index, and endothelial growth factor receptor (eGFR). Similarly, a 13-gene detection model outperformed those clinical variables in terms of detection accuracy for distinguishing patients with single complications from those with multiple ones.

In conclusion, the authors showed that the hydroxymethylation profile of cfDNA might be in the future proven as a convenient and noninvasive marker for diabetes-induced vascular complications, with the potential to complement other conventional clinical variables or risk factors for disease monitoring. Although promising, the study lacks a cause-and-effect relationship between the epigenetics changes the vascular complications.

## 6. Conclusions

In this review, we approached the origin of cfDNA until its clinical use with a deeper focus as a biomarker for endothelial injury. We showed that cfDNA is already at an advanced stage for clinical use in prenatal tests, organ transplant rejection, and cancer, where it also received a more specific abbreviation, *t*-cfDNA. In the cardiovascular system, the studies are quite new, and although interesting, stronger evidence is still needed. Among all the characteristics of the cfDNA, there is evidence indicating that the methylation

pattern of cfDNA is the most promising tool for this molecule to advance as a biomarker of tissue-specific injury, as in the case of endothelial injury.

However, some drawbacks in cfDNA methodologies should be overcome before its recommendation as a biomarker in the clinical setting. Due to its low abundance in circulation, some pre-analytical steps, such as plasma extraction, should be standardized. Some of the studies mentioned in this review have used homemade protocols, while others may have used extraction by magnetic beads, spin columns, vacuum columns, or even so many combinations from these methods. cfDNA is also rapidly cleared from the blood (from several minutes), leading to some negative data in the literature.

Finally, and perhaps the most important, is the method to detect cfDNA. The most used ones are using fluorescent probes (such as PicoGreen or SYBR Gold), RT-qPCR, and more recently, next-generation sequence (NGS) and ddPCR. The fluorescent techniques have less sensitivity and are unspecific, allowing for detection of any DNA molecule present in the circulation without any discrimination. These methods usually lead to overestimation of total cfDNA concentration. On the other hand, PCR is the most common. Although this technique overcame the problem of specificity by using specific primers to detect specific DNA sequences, it raised another problem that was the variability among the primers used by different groups.

Altogether, all of these steps in the cfDNA analysis lead to a final problem: a lack of an absolute and precise quantity of cfDNA that could be widely used as a reference value for routine clinical diagnosis. Although most studies report different amounts of cfDNA between the disease situation versus the control condition, there is still a huge variability among laboratories.

**Author Contributions:** Conception and design: L.C.G.C., V.G.B., P.F.V.; Search for articles in database: F.S.d.M., V.G.B., L.d.S., G.C., P.F.V., L.C.G.C.; Interpretation of the articles: F.S.d.M., V.G.B., L.d.S., G.C., P.F.V., L.C.G.C.; writing the article: F.S.d.M., V.G.B., L.d.S., G.C., P.F.V., L.C.G.C.; Critical revision of the article: F.S.d.M., V.G.B., P.F.V., L.C.G.C.; Obtained funding: L.C.G.C., V.G.B.; Overall responsibility: F.S.d.M., L.C.G.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** L.C.G.C. is supported by Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (Grant N° 073.11012.2019.0016578-57 and Grant N° 073.11012.2020.0007594-29), FAPESB SUS0046/2018. V.G.B. is supported by FAPES grant #151/2019-UNIVERSAL-FAPES, PRONEM 06/2019 and CNPq fellowship 308541/2018-9.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank State University of Santa Cruz (UESC) (Grant N° 073.11012.2019.0016578-57 and Grant N° 073.11012.2020.0007594-29), FAPESB SUS0046/2018, FAPES grant #151/2019-UNIVERSAL-FAPES, PRONEM 06/2019 and CNPq fellowship 308541/2018-9.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Aucamp, J.; Bronkhorst, A. J.; Badenhorst, C. P. S.; Pretorius, P. J. The Diverse Origins of Circulating Cell-Free DNA in the Human Body: A Critical Re-Evaluation of the Literature. *Biol. Rev.* 2018, 93 (3), 1649–1683; <https://doi.org/10.1111/brv.12413>.
2. MANDEL, P.; METAIS, P. Les Acides Nucléiques Du Plasma Sanguin Chez l'homme. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1948, 142 (3-4), 241–243.
3. Bendich, A.; Wilczok, T.; Borenfreund, E. Circulating DNA as a Possible Factor in Oncogenesis. *Science* (80-. ). 1965, 148 (3668), 374–376; <https://doi.org/10.1126/science.148.3668.374>.
4. Tan, E. M.; Schur, P. H.; Carr, R. I.; Kunkel, H. G. Deoxyribonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* 1966, 45 (11), 1732–1740; <https://doi.org/10.1172/JCI105479>.
5. Leon, S. A.; Shapiro, B.; Sklaroff, D. M.; Yaros, M. J. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res.* 1977, 37 (3), 646–650.