UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DANIEL ZOPPI

Estudo clínico fase II, randomizado, duplo-cego, sobre o
uso da ranitidina em pacientes diabéticos com sepse
grave e choque séptico

Ribeirão Preto

2020

DANIEL ZOPPI

Estudo clínico fase II, randomizado, duplo-cego, sobre o
uso da ranitidina em pacientes diabéticos com sepse
grave e choque séptico

Versão corrigida

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

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

Área de Concentração:
Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Marcos
de Carvalho Borges

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Zoppi, Daniel

Estudo clínico fase II, randomizado, duplo-cego, sobre o uso da ranitidina em pacientes diabéticos com sepse grave e choque séptico. Ribeirão Preto, 2020.
84 f.: il.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Marcos de Carvalho Borges

Versão original

1. Sepse. 2. Diabetes 3. Ranitidina 4. Fase 2

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de
Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIEL ZOPPI

Estudo clínico fase II, randomizado, duplo-cego, sobre o uso da ranitidina em pacientes diabéticos com sepse grave e choque séptico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências
Área de Concentração: Clínica Médica

Aprovado em _____/_____/_____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a forças superiores, por me ter me concedido força e saúde para chegar ao fim desse trabalho, e ter me iluminado na execução das tarefas desse projeto.

Agradeço especialmente à minha mãe (Regina Ortolan Zoppi), irmã (Mariana Zoppi) e pai (Jaime Tadeu Zoppi), que acreditaram no meu potencial e sempre me apoiaram incondicionalmente. Obrigada pelo amor e carinho que vocês me dedicam em tempo integral, estando perto ou longe fisicamente.

Ao meu orientador, professor Marcos de Carvalho Borges, por ter entrado comigo nessa jornada, e ter sido um sábio conselheiro e amigo durante todas as fases desse trabalho, auxiliando a contornar os obstáculos que surgiram durante esse período. Obrigado por acreditar em mim, e por entender que fica ainda mais difícil ter diversos empregos e trabalhar em pesquisa ao mesmo tempo. Fico muito grato por entender e por não ter me deixado esmorecer.

Aos queridos Rodrigo, Tânia e Leila, cuja contribuição foi inestimável para execução desse projeto e à toda equipe da Unidade de Emergência do HC. A contribuição de vocês foi muito importante para a correta inclusão de pacientes, administração de medicação e, em muitas vezes, no auxílio para coleta de sangue.

A minha banca de qualificação, prof. Carlos, prof. Rodrigo e Pedrão. A visão de vocês, a motivação e as dicas, me auxiliaram muito a melhorar e persistir.

Agradeço aos colegas de trabalho, os quais ajudaram a selecionar pacientes e também, em muitas vezes, serviam de “controle” doando seu sangue para que a pesquisa pudesse prosseguir. São nomes de muitos colegas, mas não posso deixar de comentar Volpe, que não só doou seu sangue, mas também auxiliou na estatística no momento da qualificação; Maira, com seu grande otimismo e auxílio para não deixar o projeto parar; Aron por doar sangue e me manter motivado, principalmente auxiliando em momentos que precisei ser coberto no trabalho; Mauricio, que no momento está em São Paulo, mas que no começo do projeto ajudou muito a acreditar na ideia de que poderia dar certo. Agradecimentos a Tassia, Eder, Tamarindo, Cota,

Nazir, Tirapele, Gosma, Val, Flavio e todos com quem trabalhei nesse período de pesquisa. Aprendo todos os dias com vocês. Ao colega Lucas, com quem trabalho junto em mais de um hospital, me ajudando e acreditando no meu trabalho.

A outros importantes colaboradores do projeto e do meu aprendizado, como Prof. Pazin, Prof. Zeca e Prof. Fernando, meu muito obrigado. Aos colegas do laboratório, David, Fernanda, Rafael, Juliana e Wagner, que auxiliaram na avaliação do CXCR2 e citocinas, fazendo o possível e o impossível para que pudéssemos transpor a mesma avaliação feita com camundongos em humanos. Nem sempre é fácil, “pacientes não leem livro”, mas toda descoberta começa no básico e depois precisa de um experimento testando em humanos, para, com a soma do conhecimento, possamos evoluir. A integração e ajuda de toda essa equipe do laboratório foi fundamental para meu aprendizado e para que esse projeto pudesse ser finalizado. Muito obrigado a todos.

Obrigado a Tais, amiga que tenho um enorme carinho. Não sei se agradeço como minha corretora ou pessoa que me ouve ou amiga que motiva ou uma mistura disso tudo e muito mais. Meu muito obrigado em todos os momentos que me apoiou.

Aos meus familiares em geral, primos, tias e outros, que sempre me mantiveram motivado. Em especial para minha tia Zeza e seu filhos Rafael e Chico, pelo carinho e parceria que sempre tivemos desde pequenos. Ao meu primo Lucas, também filho da Zeza, que é uma pessoa que me espelha muito pelo seu esforço, inteligência e dedicação à pesquisa; Rodrigo, um primo que admiro muito não só como pessoa, mas que tem uma carreira acadêmica invejável; Ricardo, que mesmo distante fisicamente, é um primo que sempre está do meu lado; Gustavo, mesmo que mais novo, sempre mostra entusiasmo ao perguntar de minha pesquisa; Tia Maga, pelo entusiasmo e carinho de sempre me apoiar; Beta, prima que me ajudou muito na pós graduação de maneira geral. Meu muito obrigado a todos esses e até àqueles que não coube espaço para comentar.

Finalmente, encerro esse agradecimento lembrando de cada paciente que aceitou participar do projeto, mesmo num momento de fragilidade e internação hospitalar – meu muito obrigado, sem vocês esse projeto não ocorreria. Aos voluntários, meu muito obrigado, mesmo não precisando vocês estiveram presentes.

“A persistência é o caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

ZOPPI, D. **Estudo clínico fase II, randomizado, duplo-cego, sobre o uso da ranitidina em pacientes diabéticos com sepse grave e choque séptico**. 2020. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A sepse é definida como uma disfunção orgânica ameaçadora à vida secundária à resposta desregulada do organismo a uma infecção, sendo responsável por uma alta e crescente taxa de internação hospitalar no Brasil e no mundo. Muitas comorbidades, como o diabetes, podem predispor à infecção e, consequentemente à sepse. Camundongos diabéticos com sepse apresentaram uma expressão menor de CXCR2 em neutrófilos, sendo que a administração de anti-H2 aumentou a expressão desses receptores e reduziu a mortalidade. Assim, esse estudo tem por objetivo avaliar se o uso da ranitidina, um anti-H2, nos pacientes portadores de diabetes mellitus com sepse grave ou choque séptico pode melhorar a resposta ao tratamento. Para isso, 36 pacientes portadores de diabetes mellitus, com sepse grave ou choque séptico, admitidos na Unidade de Emergência do HC-FMRP-USP entre outubro de 2014 a outubro de 2019, participaram de um estudo clínico fase 2, duplo cego, randomizado, com 2 grupos. A duração da intervenção foi de 7 dias, sendo que um grupo recebeu 300mg de ranitidina a cada 6 horas e o outro, placebo. Foram avaliados a expressão de CXCR2 na admissão (D0), no dia 2 (D2) e no dia 7 (D7), juntamente com parâmetros clínicos e dosagem de citocinas e NETs. Dentre os participantes, 18 pacientes receberam placebo (grupo A) e 17 ranitidina (grupo B). As características demográficas basais e o manejo da sepse foram semelhantes nos dois grupos. Apenas a média das glicemias dos pacientes que evoluíram para óbito foi maior no grupo que recebeu ranitidina (245mg/dL) em comparação com o placebo (149mg/dL) ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao escore SOFA, mortalidade, uso de droga vasoativa, ventilação mecânica, terapia renal substitutiva, tempo de internação e complicações hospitalares. Destaca-se que os pacientes sépticos apresentaram expressão de CXCR2 significativamente maior do que os

controles saudáveis (52% vs 85%, respectivamente, $p = 0,0063$). Os pacientes sépticos que obtiveram alta hospitalar apresentaram um aumento significativo na expressão de CXCR2 no D7 em comparação à admissão (44% vs 68%, respectivamente, $p = 0,02$). Não houve diferença significativa na expressão de CXCR2 entre os grupos placebo e ranitidina. A administração de ranitidina reduziu significativamente os níveis de IL-6 e ST2 nos dias D2 e D7, respectivamente, em comparação com o grupo que recebeu placebo. Também, indivíduos com sepse grave que receberam ranitidina apresentaram menos NETs do que o placebo no D7. Concluimos que a administração de ranitidina em pacientes com diabetes mellitus sépticos reduziu a produção de citocinas inflamatórias e NETs, e não causou efeitos colaterais. Porém a ranitidina não alterou a expressão de CXCR2 em neutrófilos. Assim, a ranitidina pode ter um efeito benéfico no tratamento da sepse em paciente com diabetes mellitus, sendo ainda necessário a realização de mais estudos.

Palavras-chave: Sepse. Diabetes. Ranitidina. Fase 2

ABSTRACT

ZOPPI, D. **A phase II randomized, double-blind, placebo controlled study of the safety and efficacy of ranitidine in diabetic patients with severe sepsis and septic shock.** 2012. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction secondary to unregulated response to infection, being responsible for a high and growing rate of hospitalization in Brazil and worldwide. Many comorbidities, such as diabetes, can predispose to infection and, consequently, to sepsis. Diabetic mice with sepsis showed reduced expression of CXCR2 in neutrophils, and the administration of anti-H2 increased the expression of these receptors and reduced mortality. Thus, this study aims to assess whether the use of ranitidine, an anti-H2, in diabetic patients with severe sepsis or septic shock can improve the response to treatment. For this, 36 diabetic patients, with severe sepsis or septic shock, admitted to the Emergency Unit of HC-FMRP-USP between October 2014 to October 2019, participated in a phase 2, double blind, randomized clinical study. The duration of the intervention was 7 days, with one group receiving 300mg of ranitidine every 6 hours and the other, placebo. The expression of CXCR2 at admission (D0), on day 2 (D2) and on day 7 (D7) were evaluated, along with clinical parameters and cytokine and NETs dosage. Among the participants, 18 patients received placebo (group A) and 17 ranitidine (group B). Baseline demographic characteristics and sepsis management were similar in both groups. Only the mean blood glucose levels of patients who died were higher in the group that received ranitidine (245mg/dL) compared to placebo (149mg/dL) ($p < 0.05$). There was no significant difference between the groups regarding the SOFA score, mortality, vasoactive drug use, mechanical ventilation, renal replacement therapy, length of stay and hospital complications. Septic patients had significantly higher CXCR2 expression than healthy controls (52% vs 85%, respectively, $p = 0.0063$). Septic patients who were discharged from hospital showed a significant increase in CXCR2 expression at D7 compared to admission (44% vs 68%, respectively, $p = 0.02$).

There was no significant difference in CXCR2 expression between placebo and ranitidine groups. Ranitidine administration significantly reduced the levels of IL-6 and ST2 on days D2 and D7, respectively, compared to the placebo group. Also, individuals with severe sepsis who received ranitidine had less NETs than placebo at D7. Thus, we conclude that administration of ranitidine in diabetic septic patients reduced the production of inflammatory cytokines and NETs, and did not cause side effects. However, ranitidine did not alter the expression of CXCR2 in neutrophils. Thus, ranitidine may have a beneficial effect in the treatment of sepsis in diabetic patients, and further studies are needed.

Keywords: Sepsis. Diabetes. Ranitidine. Fase 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo da fisiopatologia da sepse com o envolvimento das células da imunidade inata e reconhecimento de patógenos.....	26
Figura 2 - Resumo da relação da migração do neutrófilo com o receptor CXCR2.	28
Figura 3. A ação dos mastócitos e a migração de neutrófilos após o reconhecimento de patógeno na fisiopatologia da sepse.	29
Figura 4. Gráfico de sobrevivência dos camundongos após indução de sepse e tratamento com diferentes doses de ranitidina.	32
Figura 5 - Estratégia de Gate adotada para avaliação da expressão do CXCR2.	42
Figura 6 - Fluxograma de inclusão dos pacientes no estudo.	45
Figura 7 - Número de amostras analisadas para cada parâmetro do estudo e em cada momento de coleta.....	46
Figura 8 - Controle glicêmico dos pacientes nos 7 primeiros dias de internação.	49
Figura 9 - Escores SOFA na admissão, D2 e D7 nos grupos A - Placebo e B – Ranitidina	51
Figura 10 - Escores de SOFA dos pacientes com sepse grave e choque séptico na admissão, no D2 e no D7 nos grupos A - Placebo e B – Ranitidina	51
Figura 11 - Mortalidade nos grupos A (placebo) e B (ranitidina) e de acordo com a classificação (sepse e choque séptico).....	52
Figura 12 - Controle glicêmico nos óbitos e altas nos grupos ranitidina e placebo.	54
Figura 13 - Controle glicêmico dos pacientes com óbito e alta dentro de um mesmo grupo.	54
Figura 14 - Expressão de CXCR2 porcentagem e MFI comparando todos os pacientes com sepse e o controle saudável.....	57
Figura 15 - Expressão de CXCR2 em porcentagem e intensidade (MFI) em todos os pacientes e naqueles com alta hospitalar nos dias D0, D2 e D7. Os pacientes com sepse foram comparados com seus respectivos controles.....	57
Figura 16 - Comparação da expressão de CXCR2 nos grupos ranitidina e placebo.	58
Figura 17 - Citocinas nos grupos ranitidina e placebo com diferença significativa.	61
Figura 18 – IL-6 nos pacientes com alta e óbito nos grupos ranitidina e placebo.....	62
Figura 19 – Comparação do dia 7 (D7) dos grupos placebo e ranitidina em relação ao ST2 de todos os pacientes e NETs dos indivíduos com sepse grave. Avaliação de correlação entre desfecho morte e valor de ST2 e NETs no D7	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios utilizados para definição da síndrome à resposta inflamatória sistêmica (SIRS). A SIRS é definida pela presença de 2 ou mais dos 4 critérios.	21
Tabela 2 - Critérios para pontuação do escore Sequential Organ Failure Assessment (SOFA).	22
Tabela 3: Relação de instrumentos de medição utilizados em cada dia de coleta (eventos) no software RedCap™.	39
Tabela 4. Dados clínicos coletados em cada instrumento de medição no software RedCap™.	39
Tabela 5 - Características demográficas e clínicas dos pacientes com sepse nos grupos placebo (A) e ranitidina (B) no momento da randomização.	47
Tabela 6 - Principais medidas para tratamento da sepse implementadas nos grupos placebo (A) e ranitidina (B) nos 7 primeiros dias da internação.	49
Tabela 7 - Número de complicações hospitalar	50
Tabela 8 - Variação do SOFA nos dias D0, D2 e D7, e da mortalidade nos subgrupos de pacientes com diabetes descontrolada, conforme o grupo A (placebo) ou B (ranitidina), bem como sua gravidade (choque séptico ou sepse grave).	53
Tabela 9 - Desfechos clínicos nos grupos A (placebo) e B (ranitidina).	55
Tabela 10 - Características demográficas dos controles saudáveis, bem como dados de expressão de CXCR2.	56
Tabela 11 – Relação do aumento de CXCR2 entre admissão e D7 (razão D7/D0) e mortalidade.	57
Tabela 12 – Comparação do aumento de CXCR2 entre admissão e sétimo dia (D7/D0) nos grupos placebo e ranitidina.	59
Tabela 13 - Resultado de IL-6, IL-8, ST-2 e NETs conforme grupo e subgrupo.	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Sepse – Definições	20
1.2 Epidemiologia da sepse.....	23
1.3 Fisiopatologia da sepse	25
1.4 Sepse no paciente portador de diabetes mellitus.....	30
1.5 Segurança no uso da ranitidina	32
1.6 Hipótese do estudo.....	33
2. OBJETIVOS	34
2.1 Geral.....	34
2.2 Específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Participantes do estudo	35
3.2 Pacientes com sepse	35
<i>3.2.1 Critérios de inclusão</i>	<i>36</i>
<i>3.2.2 Critérios de não-inclusão</i>	<i>36</i>
<i>3.2.3 Critérios de exclusão</i>	<i>37</i>
3.3 Inclusão e acompanhamento clínico dos pacientes	37
3.4 Dias de coleta.....	39
3.5 Desfechos.....	40
3.6 Coleta do material e análises realizadas	40
3.7 Análise da expressão do receptor CXCR2 e citocinas (IL-6 e IL-8), ST2 e NETs	41
3.7.1 Expressão de CXCR2 em neutrófilo	41
3.7.1.1 Estratégia de seleção (gate) das subpopulações de neutrófilo	41
3.7.2 Quantificação de IL-6, IL-8, ST2 e NETs	42
3.8 Controles	43
3.8 Análise estatística dos dados e tamanho amostral	44
3.9 Aspectos éticos.....	44
4. RESULTADOS	45

4.1 Inclusão dos pacientes	45
4.2 Resumo das coletas realizadas	45
4.3 Características demográficas, clínicas e laboratoriais da população do estudo	46
4.4 Avaliação da expressão de CXCR2	55
4.4.1 Comparação dos controles	55
4.4.2 Avaliação dos pacientes	56
4.5 Avaliação dos níveis de IL-6, IL-8, ST-2 e NET	59
5. DISCUSSÃO	63
5.1 Inclusão, dados clínicos iniciais e manejo dos pacientes	63
5.2 Desfechos clínicos	65
5.3 Expressão de CXCR2 em neutrófilos	66
5.4 Níveis de IL-6, IL8, ST2 e NET	68
5.5 Complicações hospitalares ou eventos adversos pela ranitidina durante os 7 dias de intervenção	70
5.6 Número de pacientes incluídos no estudo	71
5.7 Considerações finais	71
5.8 Limitações do estudo	72
6. CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A - Soluções utilizadas no laboratório	83
APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sepses – Definições

A palavra *sepsis* se origina do grego, tendo como significado a “corrupção ou putrefação de tecidos ou substâncias orgânicas”. O termo ficou mais conhecido após o século XX, no entanto já existem descrições há muitos séculos, como a citação de Maquiavel, que diz:

“... como a tísica, que, segundo os médicos, a princípio é fácil de tratar e difícil diagnosticar, mas, com o passar do tempo, não tendo sido diagnosticada nem tratada precocemente, se torna fácil de reconhecer e difícil de curar” (O príncipe, 1513, p. 149).

Ainda que a noção de *sepsis* fosse conhecida, descrições mais modernas ocorreram em 1914, com Hugo Schottmuller, que escreveu “a *sepsis* está presente se houver um foco a partir do qual bactérias patogênicas, constante ou periodicamente, invadem a corrente sanguínea de maneira que isso causa sintomas subjetivos e objetivos” (Gyawali *et al.*, 2019).

Desde então, muitas pesquisas e descobertas ocorreram, chegando ao entendimento atual de que se trata de uma síndrome que pode ser resultante de bactérias, fungos, vírus, infecções parasitárias ou outros microrganismos, que desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios, os quais induzem disfunção celular no organismo afetado (Sagy *et al.*, 2013).

Para chegar à definição e à padronização atual, algumas etapas foram importantes e merecem ser mencionadas. Em 1991, ocorreu a conferência de consenso entre *American College of Chest Physicians* (ACCP) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM), na qual definiu-se síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), *sepsis*, *sepsis* grave e choque séptico (Bone *et al.*, 1992 ; Siqueira-Batista *et al.*, 2011).

A Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), cujos critérios estão resumidos na Tabela 1, é uma reação do organismo às injúrias que geram inflamação, sendo definida quando o paciente apresenta 2 ou mais dos 4 critérios. Caso essas

alterações sejam decorrentes de uma infecção, então denomina-se sepse (Bone *et al.*, 1992; Gül *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Critérios utilizados para definição da síndrome à resposta inflamatória sistêmica (SIRS). A SIRS é definida pela presença de 2 ou mais dos 4 critérios.

Critério	Valores que pontuam
Frequência Respiratória	FR > 20rpm ou PaCO ₂ < 32mmHg
Frequência Cardíaca	FC > 90bpm
Temperatura	T > 38°C ou < 36°C
Hemograma	Leucócitos > 12mil/mm ³ ou < 4mil/mm ³ ou > 10% de formas imaturas

FR: frequência respiratória; rpm: respirações por minuto; PaCO₂: pressão parcial de dióxido de carbono no sangue; FC: frequência cardíaca; bpm: batimentos por minuto; T: temperatura.

Caso a sepse gere disfunção orgânica, hipotensão responsiva a volume ou hipoperfusão, que podem ser reconhecidas por acidose láctica, oligúria, alteração no estado mental entre outras, é caracterizado a sepse grave. No entanto, se houver hipotensão não responsiva à reposição volêmica adequada, e o paciente necessitar de agentes inotrópicos ou vasopressores, é definido o choque séptico (Bone *et al.*, 1992).

Essa definição passou a ser usada por todos os países do mundo e, paralelamente, continuaram os estudos e os esforços para melhorar o reconhecimento e o tratamento da sepse. Assim, em 2004, houve a criação do *Surviving Sepsis Campaign* (SSC), o qual atualizou o conceito e as diretrizes de tratamento da sepse em 2008 e 2012, com pequenos ajustes na definição, mantendo como base a realizada em 1991 (Dellinger *et al.*, 2013).

A alteração mais significativa na definição da sepse ocorreu em 2016, com o terceiro consenso internacional para definição de sepse. Neste contexto, excluiu-se o termo sepse grave e passou-se a chamar de sepse pacientes com disfunção orgânica relacionada à infecção. A definição da disfunção orgânica passou a ser feita pelo *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), cuja pontuação está resumida na Tabela 2. Quando o paciente apresenta uma variação de pontos no SOFA maior do que 2,

secundária a uma infecção, fica caracterizada a sepse (Singer *et al.*, 2016). O diagnóstico de choque séptico foi definido como a necessidade de uso de vasopressores para manutenção da pressão arterial média ≥ 65 mmHg e uma concentração sérica de lactato sérico > 2 mmol/L (18 mg/dL), apesar de adequada infusão de fluidos (Singer *et al.*, 2016).

Além da nova definição, foi criado um outro escore com objetivo de realizar a triagem de pacientes com suspeita de sepse, denominado *quick-SOFA* (qSOFA). Os critérios do qSOFA são frequência respiratória ≥ 22 respirações por minuto; pressão sistólica ≤ 100 mmHg; alteração na escala de coma de Glasgow. Caso o paciente apresente 2 ou mais desses critérios, ou o médico continue com a suspeita, mesmo com menos de 2 pontos, deve-se colher exames e calcular o SOFA.

Tabela 2 - Critérios para pontuação do escore Sequential Organ Failure Assessment (SOFA).

Sistemas	Parâmetros	0	1	Pontuação 2	3	4
1) Respiratório	PaO ₂ /FIO ₂ mmHg	≥ 400	< 400	< 300	< 200 com suporte respiratório	< 100 com suporte respiratório
2) Coagulação	Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
3) Hepático	Bilirrubina mg/dL	< 1.2	1.2–1.9	2.0–5.9	6.0–11.9	> 12.0
4) Cardiovascular	Pressão Arterial ou necessidade de vasopressor ou inotrópico	MAP ≥ 70 mmHg	MAP < 70 mmHg	Dopamina $< 5^\#$ ou dobutamina (qualquer dose)	Dopamina 5.1–15 [#] ou epinefrina $\leq 0.1^\#$ ou norepinefrina $\leq 0.1^\#$	Dopamina $> 15^\#$ ou epinefrina $> 0.1^\#$ ou norepinefrina $> 0.1^\#$
5) SNC	Escala de coma Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
6) Renal	Creatinina mg/dL	< 1.2	1.2–1.9	2.0–3.4	3.5–4.9	> 5.0
	Produção de urina mL/dia				< 500	< 200

FIO₂: fração de oxigênio inspirado; MAP: pressão arterial média; PaO₂: pressão parcial de oxigênio; [#]: vasopressores ou inotrópicos com doses em mcg/Kg/min

Os novos critérios focam na definição de sepse como uma doença mais grave e também exigem a coleta de diversos exames para cálculo do SOFA, o que pode

trazer dificuldades em países em desenvolvimento. Assim, o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) e a Associação Brasileira de Medicina Intensiva (AMIB) se posicionaram em relação a aplicabilidade para o Brasil. Declararam que os novos critérios são amplos e adequados, no entanto, se aplicados em países em desenvolvimento, como o Brasil, poderiam aumentar a subnotificação, por dificuldade social e falta de acesso a exames. Assim, sugeriram manter o uso de lactato na definição de disfunção orgânica e que o SOFA fosse aplicado, especialmente, em estudos e avaliações epidemiológicas. Devendo ainda ser aceito a SIRS e outros sinais clínicos para definição e início do tratamento precoce (Machado *et al.*, 2016).

1.2 Epidemiologia da sepse

A sepse apresenta uma alta incidência, sendo que entre 1979 e 2000 os dados revelaram um aumento de 8,7% nos EUA (Martin *et al.*, 2003). No Brasil não é diferente. Além de alta incidência, a internação em centro de terapia intensiva (CTI) por sepse, entre 2010 e 2016, aumentou de 19,4% para 25,2%, o que gera grande impacto nos serviços de saúde. Ainda assim, a letalidade teve discreta redução, apesar da taxa continuar alta (Lobo *et al.*, 2019). A redução da letalidade também é observada em dados globais de incidência e de mortalidade entre os anos de 1990 e 2017, os quais encontram-se em queda ano a ano, ainda que com distribuição acentuadamente desigual entre os países. Além da desproporção no mundo, o impacto da sepse ainda é alto, sendo responsável por 19,7% das causas de morte globais (Rudd *et al.*, 2020).

O estudo PROGRESS, publicado em 2009, avaliou os índices de mortalidade em 37 países. Nesta investigação, o Brasil apresentou 67,4% de mortalidade por sepse, uma das taxas mais altas. Esta porcentagem foi maior do que o dobro da encontrada na Austrália (32,6%), e bem maior que a ocorrência em outros países em desenvolvimento, como, por exemplo, os 39% na Índia (Beale *et al.*, 2009).

Outro estudo avaliou 3128 pacientes, tendo sido realizado em 75 CTI's de 65 diferentes hospitais em todas as regiões do Brasil. Nessa investigação, demonstrou-

se que 16,7% dos pacientes tinham sepse, sepse grave ou choque séptico, sendo que o tempo médio de internação foi de 15 dias e a mortalidade em 28 dias de 46,6%, taxa que dispõe a situação brasileira entre as mais altas do mundo (Sales Júnior *et al.*, 2006).

Outro importante e amplo estudo observacional, The Sepsis PREvalence Assessment Database (SPREAD), selecionou dados de 2.632 pacientes advindos de 227 CTI's brasileiras, encontrando 30,2% de sepse e mortalidade de 55,7%. Projetando os dados encontrados, estimou-se que a incidência era 290 por 100.000 habitantes de casos adultos com sepse tratada em CTI por ano, o que gerava 420.000 casos anuais, dos quais 230.000 morreram no hospital (Machado *et al.*, 2017). Em 2006, Sogayar e seus colaboradores avaliaram o custo da sepse em CTI's brasileiras, observando um custo diário de US\$ 934,00 por doente (Sogayar *et al.*, 2008). Assim, os diversos estudos demonstram que a sepse tem alta incidência e mortalidade no Brasil e representa um alto custo para o Sistema Único de Saúde (SUS), além de prejuízos indiretos, como absenteísmo, morte precoce e restrição física, emocional e social.

Os fatores de risco para sepse são relacionados tanto à predisposição do paciente para desenvolver uma infecção, quanto à probabilidade do desenvolvimento de lesão de órgão alvo e virulência do agente infeccioso. Existem inúmeros fatores de risco para desenvolvimento de infecção, entre eles o uso de drogas imunossupressoras e doenças crônicas, tais como *Diabetes Mellitus* (DM), síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), câncer e outros. Os fatores de risco para o desenvolvimento de lesão de órgão são menos conhecidos, mas incluem o tipo de patógeno, a função prévia do órgão e o tempo do início do tratamento (Angus *et al.*, 2013; Angus *et al.*, 2001).

Muitos pacientes com sepse frequentemente apresentam uma ou mais doenças de base. Um estudo norte-americano avaliou 10.319.418 pacientes com sepse entre 1979 e 2000, demonstrando aumento na incidência de sepse, conforme ocorria aumento no número de comorbidades, como DPOC, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), câncer, DM, entre outras (Martin *et al.*, 2003). Apesar da mudança no perfil dos pacientes, as diretrizes atuais ainda orientam tratar todos os pacientes

de forma semelhante, já que faltam estudos para tratamentos específicos de acordo com a população acometida.

Uma importante comorbidade, que merece destaque, é o DM, o qual é encontrado em aproximadamente 17% dos indivíduos com sepse (Esper *et al.*, 2009). Além do frequente acometimento, o paciente com diabetes mellitus tem maior susceptibilidade a adquirir infecção e pode ter pior prognóstico, o que torna uma importante doença a ser compreendida (Schuetz *et al.*, 2011). Assim, a melhor compreensão da sepse no DM, bem como seus possíveis tratamentos, é algo importante de ser estudado.

1.3 Fisiopatologia da sepse

A fisiopatologia da sepse é complexa e, até hoje, não completamente compreendida. Contudo, pode ser resumida como uma imunopatologia desencadeada por uma infecção, cujo quadro clínico é dependente da resposta do organismo hospedeiro. Assim, mecanismos pró e anti-inflamatórios coexistem, muitas vezes, causando disfunção imunológica e levando a suscetibilidade do organismo (Uhle *et al.*, 2015). Segundo Bone e colaboradores, a coexistência dos estados pró e anti-inflamatório, além de desequilíbrio, causa uma imunoparalisia que dificulta a eliminação do patógeno (Bone *et al.*, 1997). Assim, para melhor compreensão dos mecanismos da sepse, conhecer a disfunção imune, etapa crítica da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, é fundamental.

Resumidamente, quando um patógeno entra no organismo (figura 1), células do sistema imune inato, como macrófagos e monócitos, reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (*Damage-associated molecular patterns* - DAMPs). Esse reconhecimento é possível por meio dos receptores do tipo Toll, iniciando transcrição de interferon, citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores. Com isso, pode-se ocorrer a formação de complexos inflamassomas, com importante maturação de citocinas como IL-1 β e IL-18 e fator de necrose tumoral (TNF), prosseguindo para uma morte celular programada por ruptura da membrana

plasmática mediada por caspase (Gotts and Matthay, 2016). Essa fase ocorre num tempo curto, sendo que as citocinas como IL-1 e IL-6 levam a lesão de órgão por vasodilatação, ativação de coagulação, extravasamento vascular e outros danos (Rittirsch *et al.*, 2008; Salomão *et al.*, 2019).

Figura 1 - Resumo da fisiopatologia da sepse com o envolvimento das células da imunidade inata e reconhecimento de patógenos.

Fonte: Gotts e Matthay (2016).

Nessa etapa inicial da sepse, nota-se que a sinalização é importante para o desencadeamento de uma cascata de reações que irão combater a infecção e, ao mesmo, tempo inflamar o organismo. Uma ação fundamental é vista nos neutrófilos,

os quais atuam no combate à infecção. Estudos demonstraram que o recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso em pacientes não sobreviventes à sepse estava comprometido (Tavares-Murta *et al.*, 2002; Kanashiro *et al.*, 2020). Adicionalmente, além da importante ação no controle da sepse, a migração de neutrófilos pode ser influenciada por diversos fatores (Lerman e Kim, 2015). Estudos com camundongos demonstraram que receptores de quimiocina CXCR2 estavam menos expressos nos neutrófilos de animais com sepse fatal quando comparados com controles e sepse não fatal. A redução na migração de neutrófilos e na expressão de CXCR2 (figura 2) estão associados com diversos fatores, como CXCL2, CCR2, ST2, GRK2 e receptores do tipo Toll 2 (Alves-Filho *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2017; Alves-Filho *et al.*, 2009; Rios-Santos *et al.*, 2007).

Ainda assim, os mecanismos envolvidos na redução da migração dos neutrófilos na sepse ainda não estão totalmente elucidados. Altas concentrações de citocinas; redução na expressão do receptor CXCR2 na membrana dos neutrófilos; aumento na expressão de GRK2 (*G protein-coupled receptor kinase-2*) nos neutrófilos; aumento na concentração sérica das proteínas de fase aguda, como alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) e hemopexina; e liberação de histamina pelos mastócitos podem estar envolvidos (Carlos *et al.*, 2006; Spiller *et al.*, 2012; Tavares-Murta *et al.*, 2001; Spiller *et al.*, 2011). Possivelmente, a degranulação de mastócitos induz falha na migração neutrofílica pela dessensibilização do receptor CXCR2 por um mecanismo dependente da expressão de GRK2, o que resulta em uma pior resposta na sepse (Carlos *et al.*, 2009; Spiller *et al.*, 2012).

Outro papel dos neutrófilos na fisiopatologia da sepse é a liberação de NETs (armadilhas extracelulares neutrofílicas, do inglês *neutrophil extracellular traps*). NETs são estruturas em forma de rede constituída de cromatina associada a peptídeos antimicrobianos que são liberadas no ambiente extracelular para auxiliar na eliminação de patógenos. Além de ser um importante mecanismo de defesa do sistema imune, as NETs também foram implicadas em inflamação excessiva levando a dano tecidual, potencialização da autoimunidade e promoção de trombose vascular (Denning *et al.*, 2019).

Figura 2 - Resumo da relação da migração do neutrófilo com o receptor CXCR2.

Fonte: Shen *et al.*, 2017.

Outras importantes células na fisiopatologia da sepse são os macrófagos e os mastócitos (MC), os quais agem no combate à bactéria com ações pró e anti-inflamatórias (figura 3).

Resumidamente, os macrófagos, durante a fase inicial, se diferenciam em um perfil denominado macrófago M1, e agem na eliminação de microrganismos invasores e na produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF, IL-1, IL-6, IL-8. Após esta primeira fase, ocorre apoptose e os macrófagos remanescentes são polarizados para um perfil denominado M2, promovendo reparo tecidual e produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (Murray e Wynn, 2011).

Em relação aos mastócitos (figura 3), é possível observar que eles atuam no recrutamento de neutrófilos através da secreção de citocinas e proteases, como CXCL1, CXCL2 e TNF. Também, estimulam a atividade antimicrobiana dos neutrófilos por IL-6 (Johnzon *et al.*, 2016). Outra importante ação ocorre com a liberação de

histamina, que interfere na ação de neutrófilos. Alguns estudos demonstraram que pacientes portadores de diabetes mellitus com sepse apresentavam níveis mais altos de histamina, o que, nesse sentido, pode reduzir o recrutamento de neutrófilos. Somando-se ao fato dos mastócitos produzirem histamina, destaca-se que o neutrófilo pode, ele mesmo, produzir histamina. Essa característica atenua o mecanismo microbicida contra bactérias (Johnzon *et al.*, 2016; Branco *et al.*, 2018). Assim, o excesso de histamina pode ser prejudicial para a resposta à infecção.

Figura 3. A ação dos mastócitos e a migração de neutrófilos após o reconhecimento de patógeno na fisiopatologia da sepse.

Fonte: Johnzon *et al.*, 2016.

Todos esses mecanismos presentes na fisiopatologia da fase precoce da sepse podem levar à disfunção orgânica nos pacientes, além de outros riscos, caso ingresse em fase hiperinflamatória. Passada essa fase inicial, ocorre uma etapa com predomínio de hipoinflamação e subsequente imunossupressão, as quais podem facilitar infecções hospitalares e outras complicações (Cecconi *et al.*, 2018).

Estudo com camundongos considerou sepse tardia animais com óbito após quarto dia de sepse. Na fase inicial ocorre um aumento de IL-6, com redução naqueles que sobrevivem mais do que 4 dias. Após isso, alguns animais mantiveram IL-6 reduzida com uma imunossupressão até a morte. Já outros, reduziram IL-6, mas voltaram a ter aumento dias antes da piora clínica e óbito, sugerindo nova imunoestimulação (Xiao *et al.*, 2006).

A avaliação de mortalidade em pacientes sépticos sugerem 3 momentos com picos de óbitos: até o quinto dia; do sexto até o décimo quinto dia; acima do décimo sexto dia. As 2 fases mais tardias são acompanhadas de nova positividade de culturas, bem como surgimento de bactérias oportunistas e de fungos. Essa fase mais tardia necessita, portanto, de mais estudos para seu entendimento e para obter uma identificação precoce, melhorando as perspectivas de tratamento (Otto *et al.*, 2011).

A intensidade e a gravidade dessas etapas são variadas e pouco conhecidas, sendo que sua ocorrência dependente de múltiplos fatores, como, por exemplo, a genética do indivíduo, as comorbidades, o tipo de patógeno que o atingiu, a virulência e a quantidade de agentes agressores (Cecconi *et al.*, 2018).

Assim, torna-se importante não só o tratamento no início da sepse, mas os cuidados para se evitar complicações. E, neste sentido, seria importante que também se realizassem pesquisas para entender a fase tardia hospitalar da sepse.. Além disso, deve-se manter atenção no pós alta, já que há dados que sugerem aumento mortalidade nos anos seguintes à alta por sepse (Prescott *et al.*, 2016).

1.4 Sepse paciente portador de diabetes mellitus

DM é uma importante comorbidade, frequentemente encontrada em indivíduos hospitalizados, a qual confere aos pacientes uma predisposição para

desenvolver infecção e, conseqüentemente, sepse. Algumas pesquisas sugerem maior mortalidade nesse grupo de pacientes (Schuetz *et al.*, 2011). Ainda, existem 2 principais classificações do acometimento do diabetes mellitus, o tipo 1 e o tipo 2. O primeiro geralmente acomete indivíduos mais jovens, tem relação com auto imunidade e possui alteração da célula β com dependência total de insulina. Já o segundo, acomete mais adultos, tem relação com deficiência parcial da célula β relacionado com resistência insulínica, o que leva a dependência quantidade variada de insulina (Eizirik *et al.*, 2020). Estudos sugerem que os 2 tipos de DM têm suscetibilidade a infecção, sendo que o tipo 1 pode ser ainda mais suscetível que o 2 (Carey *et al.*, 2018).

Em estudos experimentais, o DM aumenta a susceptibilidade a infecção por diversos patógenos, tais como *Staphylococcus aureus*, bactérias Gram-negativas e outros (Koh *et al.*, 2012). Embora esteja bem estabelecido que o DM favorece o surgimento de infecções, os mecanismos envolvidos ainda não são totalmente elucidados (Schuetz *et al.*, 2011; Alba-Loureiro *et al.*, 2007). Uma das possíveis explicações é a redução na imunidade causada pela hiperglicemia (Koh *et al.*, 2012).

Estudos experimentais e clínicos demonstraram alterações nas funções dos neutrófilos na presença de DM, tais como alterações na adesão e migração ao sítio inflamatório, quimiotaxia, fagocitose e atividade microbicida (Delamaire *et al.*, 1997; Carlos *et al.*, 2006). Essas etapas são fundamentais para a chegada dos neutrófilos e erradicação do foco infeccioso. Pacientes com sepse grave também apresentam redução da migração dos neutrófilos, o que está relacionado com a mortalidade (Tavares-Murta *et al.*, 2002).

Um estudo experimental demonstrou que camundongos diabéticos com sepse e choque séptico apresentavam redução na migração de neutrófilos para o foco da infecção, internalização do receptor CXCR2, e aumento na expressão de GRK2 (Carlos *et al.*, 2013). Além disso, esse estudo demonstrou que os mastócitos eram importantes por liberarem citocinas que interferiam na migração de neutrófilos. Também, liberavam histamina, que diminuiu a migração de neutrófilos para o foco da infecção, resultando em inadequado controle do foco infeccioso e altas taxas de mortalidade. Adicionalmente, o pré-tratamento com cimetidina, um antagonista dos

receptores H₂(anti-H₂), reduziu os níveis de histamina; com isso, inibiu a redução da migração dos neutrófilos; aumentou a expressão do receptor CXCR2 e as taxas de sobrevivência dos animais diabéticos submetidos a sepse sem, no entanto, alterar a glicemia dos animais (Carlos *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram obtidos quando se utilizou ranitidina como tratamento, que apresentou um efeito dose-dependente (figura 4). Esses resultados demonstram que a inibição sistêmica dos receptores H₂ pode ter um efeito benéfico no tratamento de infecções em pacientes com diabetes mellitus.

Figura 4. Gráfico de sobrevivência dos camundongos após indução de sepse e tratamento com diferentes doses de ranitidina.

Fonte: Dados não publicados

1.5 Segurança no uso da ranitidina

A ranitidina é um anti-H₂ frequentemente utilizado na prática médica para o tratamento de doença péptica, doença do refluxo gastroesofágico, síndrome Zollinger-Ellison e na profilaxia de sangramentos digestivos em pacientes com sepse. As doses utilizadas variam de 150 a 3.000 mg/dia. A ranitidina está no mercado em pelo menos 120 países desde 1981 e seu uso está relacionado a poucos efeitos colaterais (menos do que 1%), sendo os principais cefaleia, náusea, vômitos e dor abdominal. A ranitidina, mesmo quando utilizada em altas doses, apresenta poucos efeitos colaterais, baixa interação medicamentosa e não tem evidência de que altere

a função renal, apesar de ter excreção renal (Mills *et al.*, 1997; Roufail *et al.*, 1992; Collen *et al.*, 1995).

Além disso, a ranitidina, bem como o inibidor de bombas de prótons, são medicações que podem ser usadas na sepse para profilaxia de úlcera gástrica (Rhodes *et al.*, 2017). Ainda, o anti-H2 previne mais sangramento gastrointestinal, além de permitir que pacientes em ventilação mecânica tenham menos complicações, como pneumonia e infecção pelo *Clostridium difficile* (Maclaren *et al.*, 2014). No entanto, mais estudos ainda são necessários para certificar se o uso de anti-H2 realmente acarreta menores complicações e maior proteção do que o inibidor de bombas de prótons (Maclaren *et al.*, 2015).

Além de segura e poder ser usada na sepse, a ranitidina foi utilizada em pós-operatório de cirurgias abdominais, sendo observado possível benefício na redução de complicações infecciosas e melhora na função de neutrófilos e monócitos (Nielsen *et al.*, 1994; Moesgaard *et al.*, 1998). Esses benefícios do uso da ranitidina levam a reflexão sobre outras utilizações dessa medicação, além do seu uso como protetor gástrico (Nielsen, 1996). Assim, considerando seu efeito benéfico na resposta à sepse em camundongos diabéticos (Carlos *et al.*, 2013), torna-se importante avaliar se esse benefício pode, também, ocorrer em humanos.

1.6 Hipótese do estudo

Desta forma, formulamos a hipótese de que o uso da ranitidina, um antagonista dos receptores H2, poderá melhorar a migração de neutrófilos e a expressão do receptor CXCR2 nos neutrófilos e, conseqüentemente, melhorar o controle da infecção e reduzir a morbimortalidade de pacientes portadores de diabetes mellitus com sepse grave ou choque séptico.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar se a ranitidina, um anti-H2, pode melhorar a resposta ao tratamento de pacientes portadores de diabetes mellitus com sepse ou choque séptico.

2.2 Específicos

Em pacientes com sepse grave e choque séptico:

- Avaliar o efeito da ranitidina na expressão do receptor CXCR2;
- Avaliar o efeito da ranitidina na disfunção de órgão;
- Quantificar o efeito da ranitidina na produção de citocinas inflamatórias;
- Correlacionar os dados de evolução clínica com os dados laboratoriais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Participantes do estudo

Foram incluídos pacientes nas primeiras 48h de admissão na Unidade de Emergência (UE) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) com relato de ter diabetes mellitus ou ter a presença de glicemia na admissão maior que 200mg/dL, associado ao diagnóstico clínico de sepse grave ou choque séptico, de acordo com os critérios propostos pelo *Surviving Sepsis Campaign* (Dellinger *et al.*, 2013).

3.2 Pacientes com sepse

O diagnóstico de sepse foi realizado pela equipe médica da UE-HCFMRP-USP, pela presença da SIRS atribuída a uma infecção. A SIRS foi definida pela presença de pelo menos dois dos seguintes critérios (Bone *et al.*, 1992):

- Temperatura corpórea maior que 38°C ou menor que 36°C;
- Frequência cardíaca maior que 90 bpm;
- Frequência respiratória maior que 20 ipm ou PaCO₂ menor que 32 mmHg;
- Contagem de leucócitos maior que 12.000 células/mm³, menor que 4.000 células/mm³, ou presença de mais que 10% de bastonetes.

A confirmação de infecção foi feita pela equipe médica por critérios clínicos, exames de imagem (radiografia de tórax, ultrassonografia, tomografia computadorizada), exames laboratoriais (urina I, hemograma, proteína C reativa) e microbiológicos (hemocultura, urocultura, cultura de líquido, cultura de abscesso, etc). Esses exames são rotineiramente solicitados de acordo com a suspeita clínica.

Em relação ao critério de disfunção orgânica para diagnóstico de sepse grave, selecionou-se os pacientes com um dos abaixo, critérios que eram vigentes no momento em que esse projeto foi escrito (Dellinger *et al.*, 2013):

- Hipotensão induzida pela sepse, definida por uma pressão arterial sistólica (PAS) < 90mmHg ou queda da PAS de 40 mmHg sobre o valor basal do paciente ou pressão arterial média (PAM) < 65mmHg;
- Lactato > 2mmol/dL;
- Bilirrubinas totais > 2mg/dL;
- Relação $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ < 250 ou < 200 na presença de pneumonia;
- INR > 1,5 ou TTPA > 60segundos;
- Contagem de plaquetas < 100.000cél/mm³;
- Creatinina > 2mg/dL ou aumento de 0,5mg/dL da creatinina basal;
- Diurese menor que 0,5mL/Kg/h nas últimas 2 horas (após ressuscitação volêmica adequada).

Para choque séptico, no entanto, usou-se a definição de hipotensão, conforme a definição acima, a despeito de reposição adequada de volume associada a necessidade de amina vasoativa ou inotrópico.

3.2.1 Critérios de inclusão

- Idade ≥ 18 anos, de ambos os sexos;
- Capacidade do participante ou representante legal decidir quanto à participação ou não;
- Pacientes admitidos na UE-HCFMRP/USP com diagnóstico de sepse grave ou choque séptico.
- Ter relato de ter diabetes mellitus ou apresentar glicemia capilar na admissão maior ou igual a 200mg/dL.

3.2.2 Critérios de não-inclusão

- Uso crônico de corticosteroides (mais de 30 dias);
- Gestantes;
- Participação em outro estudo;

- Neutropenia febril;
- Doença linfoproliferativa conhecida;
- Paciente HIV positivo;
- Paciente em cuidados paliativos;
- Realização de quimioterapia nos últimos 30 dias;
- Recusa em assinar termo de consentimento (TCLE);
- Necessidade durante a internação de uso de ranitidina ou outro anti-H2 para tratamento;
- Relatar fazer uso regular de ranitidina ou outro anti-H2.

3.2.3 Critérios de exclusão

- Solicitação de exclusão do estudo por parte do paciente ou representante legal;
- Algum dos critérios de não inclusão ser descoberto durante a internação.

3.3 Inclusão e acompanhamento clínico dos pacientes

O paciente selecionado para o estudo na admissão da UE-HCFMRP-USP teve, na ocasião, seus critérios de inclusão confirmados pelo pesquisador responsável. O contato do pesquisador com o paciente ou seu responsável, explicitava sobre a pesquisa, aplicando-lhe o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após assinado, o pesquisador passava a inserir os dados do paciente no software RedcapTM, inclusive a classificação em sepse grave ou choque séptico.

Em seguida, a Unidade e Pesquisa Clínica da Unidade de Emergência (UPC-UE) fora avisada e, a partir daí, fazia-se a randomização por meio de uma lista que foi gerada eletronicamente, utilizando software apropriado (Research Electronic Data Capture: project-redcap.org). O sigilo da lista de randomização foi mantido durante todo o estudo.

Tendo feita a randomização, apenas a equipe da UPC-UE estava ciente sobre qual grupo o paciente havia sido alocado. Preparava-se então um kit, pelo qual seria administrado ao voluntário conforme esquema abaixo:

- GRUPO PLACEBO

- Solução salina isotônica (placebo), EV, 120 mL de 6/6 h por 7 dias.

- GRUPO INTERVENÇÃO

- Ranitidina, EV, 300 mg, completados em solução salina isotônica para um volume final de 120ml de solução de 6/6h por 7 dias. Caso o paciente tivesse clearance de creatinina < 50mL/min, foi utilizada a dose de 300 mg12/12h (Mills *et al.*, 1997; Roufail *et al.*, 1992; Collen *et al.*, 1995).

Para definir a dose da ranitidina a ser utilizada, buscou-se como base metodológica os experimentos realizados por Carlos e colaboradores (Carlos *et al.*, 2013), somados a experimentos adicionais (dados não publicados). Como o melhor resultado obtido foi com 20mg/Kg (figura 4), considerando uma pessoa de 60Kg, a dose optada foi de 1200mg/dia, a qual foi dividida em doses de 300mg 6/6h. Como já descrito anteriormente, trata-se de uma dose segura, que já foi utilizada previamente, sem descrição de eventos adversos significativos.

Como o kit era dispensado em uma caixa fechada e era prescrito como “medicação da pesquisa”, a pesquisa ficou cega para médico, estatístico, paciente e farmacêutico. Como não foi possível fazer embalagens idênticas para a ranitidina e o placebo, somente a equipe da enfermagem sabia o que estava administrando, porém não comunicava a nenhum outro membro da equipe de pesquisa.

A administração da medicação seguia por 7 dias, suspendendo apenas se suspeita de evento adverso ou alta ou óbito. Após esse período, o paciente mantinha com os cuidados da internação, sendo que o pesquisador reavaliava o paciente no momento do desfecho de alta ou óbito ou exclusão do estudo.

3.4 Dias de coleta

As coletas de sangue para dosagem do CXCR2 foram realizadas na admissão do paciente (D0), no segundo dia (D2) e no sétimo dia (D7) de internação. Foram coletados, conjuntamente, dados clínicos e demográficos, tais como SOFA, SAPS III, APACHE II, glicosimetria, bem como os dados de evolução clínica. A fim de sistematizar e organizar o estudo, as datas de coleta foram criadas como “eventos” no Redcap™ e, em cada evento, havia uma série de instrumentos de medição, conforme apontado na Tabela 3. Os dados clínicos reportados para cada instrumento de medição estão listados na Tabela 4.

Tabela 3: Relação de instrumentos de medição utilizados em cada dia de coleta (eventos) no software RedCap™.

Instrumento	Admissão	D1	D2	D3 a 6	D7	Desfecho
Dados clínicos de admissão	X					
Dosagem CXCR2 e citocinas	X		X		X	
SOFA	X		X		X	
SAPS III	X					
APACHE II	X					
Glicosimetria, função renal e administração da intervenção	X	X	X	X	X	
Avaliação geral/Complicações	X	X	X	X	X	X

Tabela 4. Dados clínicos coletados em cada instrumento de medição no software RedCap™.

Dados clínicos de admissão	Nome, sexo, idade, peso, origem, data de admissão no serviço hospitalar, comorbidades, medicações em uso regular, aspectos clínicos (como temperatura axilar, frequência cardíaca, frequência respiratória, etc.), foco infeccioso, uso de droga vasoativa, antibioticoterapia iniciada, valores de lactato sérico.
SOFA*	Valores de PaO2 de gasometria arterial, plaquetas em hemograma, bilirrubina total, creatinina sérica, diurese nas últimas 24 horas, medidas de pressão arterial, entre outros.
SAPS III*	Duração e local de internação prévia, qual o tipo de admissão, motivo da admissão, temperatura axilar, frequência cardíaca, Ph de gasometria arterial.
APACHE II*	Medidas de pressão arterial, frequência respiratória, sódio e potássio séricos, hematócrito, PaCO2 em gasometria arterial, entre outros.
Glicosimetria, função renal e intervenção	Glicosimetria capilar média das medidas ao longo do dia, função renal, ajuste de medicação e checagem se o placebo e/ou ranitidina foram realizados.
Avaliação geral/Complicações	Ocorrência de alta, óbito ou continuação da internação, necessidade de acesso venoso central, necessidade de ventilação mecânica, ocorrência de complicações e infecções secundárias, suspeita de evento adverso a intervenção.

*SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; SAPS III: Simplified Acute Physiology Score; APACHE II: Severity of Disease Classification System.

Os dados clínicos registrados no software foram utilizados para compor o banco de dados dos pacientes incluídos no estudo, determinar a inclusão ou não de pacientes com suspeita de sepse e classificar a gravidade da sepse. Além disso, os registros foram utilizados como dados brutos para as análises de comparação com os resultados experimentais obtidos posteriormente. Adicionalmente, foram registrados a ocorrência ou não de óbito, exclusão do estudo, alta hospitalar e complicações, tais como: pneumonia hospitalar, infecção relacionada a sonda vesical de demora, úlcera com necessidade de desbridamento, infecção relacionada a cateter, troca de antibiótico por piora clínica mais a suspeita de infecção hospitalar e de sangramento.

3.5 Desfechos

Foi considerando como desfecho primário a expressão do receptor CXCR2 em neutrófilos. Como desfechos secundários foram considerados a variação do SOFA; sobrevida em 7 dias; sobrevida hospitalar; necessidade de droga vasoativa, ventilação mecânica e terapia renal substitutiva; presença de complicações hospitalares e alteração na produção de IL-6, IL-8, ST2 e NET.

3.6 Coleta do material e análises realizadas

Em cada momento de coleta, foram obtidos dois tubos, sem anticoagulante, e dois tubos com EDTA, com aproximadamente 3 mL de sangue cada. Alíquotas de soro e de plasma foram armazenadas em freezer -80°C para posterior análise de citocinas e outros componentes importantes da inflamação.

Outra parte da amostra foi devidamente armazenada em recipiente contendo gelo e imediatamente transportada para o laboratório da inflamação e dor (LID), coordenado pelo Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, localizado no prédio central do campus da FMRP-USP-Ribeirão Preto, para a avaliação da expressão do receptor CXCR2 dos neutrófilos.

Para essas análises, algumas soluções foram utilizadas, conforme descritas no apêndice A.

3.7 Análise da expressão do receptor CXCR2 e citocinas (IL-6 e IL-8), ST2 e NETs

3.7.1 Expressão de CXCR2 em neutrófilo

Para a expressão do CXCR2 em neutrófilo, realizada análise de amostras de sangue total, por meio da técnica de citometria de fluxo, conforme já padronizada (Alves-Mestriner *et al.*, 2007; Souto *et al.*, 2011). Brevemente, 100 µl de sangue total foi adicionado em tubo de ensaio plástico específico para citometria de fluxo. Em seguida, foram adicionados 5 µl do anticorpo que reconhece o marcador CXCR2 (R&D; FAB331P) na cor PE e 1,5 µl do anticorpo que reconhece o marcador CD15 (eBioscience; 11-0159-73) na cor FITC. Os tubos contendo amostra e o *mix* dos anticorpos monoclonais extracelulares foram gentilmente homogeneizados. Em seguida, os tubos foram protegidos da luz e incubados em repouso por 30 minutos, a 4 °C. Após incubação, as amostras foram lavadas com 2 ml de tampão para lise de hemácias e centrifugadas a 400 g por 10 minutos, o processo foi repetido por mais duas vezes. Na sequência, as amostras foram lavadas com 2 ml de PBS contendo 2 % de soro bovino fetal, centrifugadas a 400 g por 10 minutos e ressuspensas em 80 µl de solução de formaldeído a 1 % em PBS. Após os procedimentos descritos, as amostras foram adquiridas em FACSverse (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ). As análises foram realizadas utilizando o programa FlowJo(v. IX), que permitiu analisar todas as células adquiridas, as quais foram individualizadas por janelas (Gates).

3.7.1.1 Estratégia de seleção (gate) das subpopulações de neutrófilo

Inicialmente foram selecionados as singlets (FSC-H vs. FSC-A). Em seguida, a população de polimorfonucleares foi selecionada e acordo de acordo com tamanho (FSC – dispersão frontal) e complexidade interna (SSC – dispersão lateral), conforme ilustrado na figura 5. Em seguida, com o marcador anti CD15, a população de neutrófilos foram identificados. Por fim, a frequência de neutrófilos positivos para

marcador de CXCR2 (%) foi observada. Também, a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) do CXCR2 foi analisada.

Figura 5 - Estratégia de Gate adotada para avaliação da expressão do CXCR2.

3.7.2 Quantificação de IL-6, IL-8, ST2 e NETs

A concentração de IL-6, IL-8 e sST2 foi avaliada no soro coletado de pacientes diagnosticados com sepse ou de voluntários saudáveis. A determinação de seus níveis foi realizada por método imunoenzimático (ELISA). Resumidamente, as placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 µl/ poço do anticorpo específico anti-IL-6 (BD), anti-IL-8 (eBioscience) e anti-sST2 (RD) nas concentrações descritas pelos fabricantes. Esses anticorpos foram diluídos em solução de ligação (*coating buffer*) e incubados por 18-24 horas a 4°C. As placas foram lavadas por quatro vezes com PBS/Tween-20 (0,05 % Sigma). As ligações não-específicas foram bloqueadas com 200 µl de PBS contendo BSA 1 % (para kits da RD) ou 200 µl de PBS contendo soro bovino fetal inativado 10% (para kits BD e eBioscience) durante 1 hora a 37 °C. As amostras e o padrão (curva-padrão) contendo as concentrações adequadas de IL-6 (4000 pg/ml), IL-8 (5000 pg/ml) e sST2 (20 ng/ml) foram colocados nas placas (50 µl) e incubados overnight a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 µl dos anticorpos biotinilados específicos para cada citocina foi adicionado na concentração descrita pelo fabricante. Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween e o conjugado avidina-peroxidase. A seguir, as placas foram

incubadas por 45 min. Posteriormente, elas foram lavadas com PBS/Tween e o substrato (TMB) foi adicionado. A densidade óptica foi medida a 630 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). A concentração das citocinas contidas nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão com 12 pontos obtidos por diluição seriada. Os resultados foram expressos em pg/ml.

Em relação à quantificação de NETs no plasma foi realizada utilizando o método MPO-DNA PicoGreen. Brevemente, foi utilizada uma placa *Black Plate Clear Bottom* (Sigma-Aldrich) com anti-MPO (1:1000, ThermoFisher), por 12 horas à 4°C. A placa foi lavada em solução de PBS-Tween 0,5% e incubada com as amostras por 12 horas à 4°C. Após nova lavagem, foi adicionado o reagente fluorescente (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA assay Kit, Invitrogen) conforme o protocolo do fabricante e em seguida foi feita a leitura dos dados no aparelho FlexStation® 3, com excitação a 488nm e emissão a 525nm. Os resultados foram expressos em ng/ml.

3.8 Controles

O grupo controle foi composto na sua maioria por profissionais de saúde presentes na UE-HCFMRP-USP na data da coleta. Em todos os dias nos quais houve coleta de amostras de pacientes (D0, D2 ou D7), também foi realizada coleta de sangue de um controle saudável, independentemente do número de pacientes.

Os voluntários eram saudáveis, sem uso de medicação ou comorbidade conhecida, sendo que alguns voluntários serviram de controle em mais de um momento dos experimentos.

O sangue do voluntário saudável e do paciente foram coletados no mesmo instante, sendo que uma amostra de ambos foi transportada para o laboratório de inflamação e dor (LID), coordenado pelo Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, localizado no prédio central do campus da FMRP-USP-Ribeirão Preto para avaliar a expressão de CXCR2 do paciente no mesmo dia que se avaliava a expressão do controle. Outra amostra do controle foi centrifugada e, posteriormente, armazenada para ser utilizada como controle da avaliação de citocinas.

3.8 Análise estatística dos dados e tamanho amostral

Para descrição dos grupos, as variáveis categóricas foram expressas em porcentagem e as variáveis contínuas em média e desvio padrão, quando distribuição normal, e mediana e intervalo interquartil, quando distribuição não-normal.

Nas análises de comparação, para variáveis categóricas foi utilizado o teste exato de Fisher ou do Qui-Quadrado para análise entre dois grupos e vários grupos, respectivamente. Para as variáveis contínuas, foi utilizado o teste t de Student. Análises não paramétricas entre grupos foram realizadas com o teste de Mann-Whitney.

Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no *software* Stata^(R) 12.0.

O tamanho da amostra foi calculado baseando-se em dados conhecidos previamente (Sakpal *et al.*, 2010) de dosagem de CXCR2 em humanos (Cummings *et al.*, 1999), bem como na resposta encontrada no experimento com camundongos (Carlos *et al.*, 2013). Considerando o estudo como 2 grupos independentes (placebo e intervenção), a variável de desfecho principal contínua, uma expressão média de CXCR2 de $11,84 \pm 4,2$, alfa de 0,05, poder de 90%, um aumento de pelo menos 50% no grupo intervenção (17,76), o tamanho amostral deve ser de 22 pacientes (11 em cada grupo).

3.9 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP com o parecer 608.051, com data de 08/04/2014 (CAAE 26646214.3.0000.5440). Os voluntários desse estudo, ou seus representantes legais (em caso de incapacidade do participante), receberam informações sobre os objetivos do estudo, procedimentos envolvidos e riscos. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento antes de qualquer participação no estudo (Apêndice B). O estudo foi conduzido em conformidade com as resoluções nacionais e internacionais como descritas nos seguintes documentos: Resolução CNS 196/96, Declaração de Helsinque e todas as suas revisões e alterações, Documento de Las Américas (Brasil, 1998).

4. RESULTADOS

4.1 Inclusão dos pacientes

A inclusão dos pacientes foi realizada no período de 07/10/2014 a 19/10/2019, e está ilustrada no fluxograma da Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma de inclusão dos pacientes no estudo.

4.2 Resumo das coletas realizadas

Dos 36 pacientes randomizados, 26 pacientes foram avaliados quanto à expressão do CXCR2, sendo 25 avaliações no D0, 22 no D2 e 19 no D7, os quais estão divididos nos grupos Placebo (A) e Ranitidina (B) conforme ilustrado na Figura 7.

Em relação ao soro armazenado dos pacientes, foram dosados os níveis das citocinas IL-6, IL-8, ST-2 e NETs de 28 pacientes no D0, 27 no D2 e 20 no D7, sendo a distribuição nos grupos mostrada na Figura 7.

Figura 7 - Número de amostras analisadas para cada parâmetro do estudo e em cada momento de coleta.

	D0	D2	D7
CXCR2	Todos os pacientes		
	25	22	19
	Grupo Placebo – A		
	12	11	11
	Grupo Ranitidina – B		
	13	11	8
IL-6, IL-8, ST2 e NET	Todos os pacientes		
	28	27	20
	Grupo Placebo – A		
	14	14	11
	Grupo Ranitidina – B		
	14	13	9

4.3 Características demográficas, clínicas e laboratoriais da população do estudo

Os dados clínicos e laboratoriais dos 36 pacientes incluídos no estudo estão resumidos na Tabela 5, bem como a randomização, a qual foi considerada adequada, sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 5 - Características demográficas e clínicas dos pacientes com sepse nos grupos placebo (A) e ranitidina (B) no momento da randomização.

Características	Grupo Placebo (A) 18 pacientes	Grupo Ranitidina (B) 18 pacientes
Sexo ^a		
Feminino	8 (44,4)	11 (61,1)
Masculino	10 (55,5)	7 (38,8)
Peso (Kg) ^b	79,8 ± 20,1	76,7 ± 16,6
Idade (anos) ^b	54 ± 18	54 ± 14
SOFA adm. ^b	7,3 ± 3,5	8,3 ± 4,8
APACHE II ^b	18,5 ± 7,5	17,4 ± 6,9
SAPS III ^b	39 ± 14,3	39,4 ± 12,9
Classificação ^a		
Sepse grave	10 (55,5)	9 (50,0)
Choque séptico	8 (44,4)	9 (50,0)
Índice de Comorbidades de Charlson ^c	4,5 ± 3,2 (2,8-6,1)	4 ± 2,4 (2,8-5,2)
Sítio da infecção ^a		
Respiratório	10 (55,5)	8 (44,4)
ITU	3 (16,6)	3 (16,6)
Pele	2 (11,1)	5 (27,7)
Abdominal	1 (5,5)	2 (11,1)
Outros	2 (11,1)	0 (0)
Cetoacidose na adm. (sim) ^a	3 (16,6)	1 (5,5)
Diabetes ^a		
DM tipo 1 / DM tipo 2	4 (22,2) / 14 (77,7)	3 (16,6) / 15 (83,3)
Em uso de hipoglicemiante oral	7 (38,8)	7 (38,8)
Em uso de insulina	8 (44,4)	10 (55,5)
Sem DM, mas glicemia adm. > 200mg/dL	3 (16,6)	1 (5,5)
Hemoglobina glicosilada (%) ^c	9,1 ± 3,5 (7,7-11,2)	9,1 ± 2,9 (8,5-11,5)
Hemoglobina glicosilada > 7% (sim) ^a	11 (61,1)	15 (83,3)
Glicemia na adm. (mg/dL) ^c	229 ± 99,9 (211,2-310,6)	231,5 ± 108,5 (219-326,9)
Lactato na adm. ^c	2,5 ± 3,4 (2,1-5,6)	2,7 ± 2,2 (2,1-4,4)
Proteína C Reativa na adm. (mg/dL) ^c	19,1 ± 9,1 (12,3-21,7)	19,4 ± 9,4 (13,8-23,1)
Creatinina na adm. ^c	2 ± 2 (1,6-3,6)	2 ± 1,8 (1,5-3,3)
Lesão Renal Aguda na adm. (sim) ^a	13 (72,2)	14 (77,7)
Tempo da adm, até dose 1ª dose de ranitidina ou placebo (h) ^b	26,1 ± 10,8	23,3 ± 12,2
Hemocultura ^a		
Negativa	12 (66,6)	14 (82,3)
Bactéria Gram-positiva	4 (22,2)	2 (11,7)
Bactéria Gram-negativa	2 (11,1)	1 (5,8)

SOFA = Sepsis-related Organ Failure Assessment; adm = admissão; APACHE II = Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; SAPS III= Simplified Acute Physiology Score III; ITU = Infecção do trato urinário; ^a valor expresso em número de pacientes (%); ^b valores expressos em média ± desvio padrão; ^c valores expressos em mediana ± desvio padrão (IC 95%). Todas as comparações mostraram que não existe diferença significativa entre os grupos.

Dos 36 pacientes, a maioria foi do sexo feminino (19 pacientes, 52,7%); a média de idade foi 54 ± 16 anos; cerca de metade teve sepse grave (19 pacientes, 52,7%) e o restante choque séptico (17 pacientes, 47,2%). A letalidade geral durante a internação foi de 28,57% (10 óbitos), sendo maior em pacientes com choque séptico, (7 pacientes, 43,75%), do que com sepse grave (3 pacientes, 15,79%). Em todos os pacientes foi diagnosticado o sítio da infecção, sendo a mais frequente a infecção respiratória em 18 (50%) pacientes. Em relação à comparação entre os grupos, não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados ($p > 0,05$).

A maioria das infecções não foi evidenciada pelo exame de hemocultura. Ainda assim, 9 (25,7%) pacientes tiveram positividade nesse exame que foi coletado no período inicial da internação. Dos agentes mais frequentemente identificados por alguma forma de cultura, quatro foram *Staphylococcus aureus*, três *Enterococcus faecalis* e duas *Escherichia coli*.

Sobre o tratamento da sepse, os grupos receberam cuidados semelhantes, sendo que as medidas instauradas eram feitas pelo médico assistente, o qual utilizava do protocolo vigente na instituição. Assim, todos pacientes foram tratados baseados nas diretrizes do *Surviving Sepsis Campaign* (SSC). A tabela 6 apresenta a comparação entre o grupo ranitidina e placebo, sendo que as principais medidas foram semelhantes entre os grupos, exceto pelo controle glicêmico, o qual apresentou diferença significativa apenas no 5º dia de internação, sendo a glicemia média maior no grupo que recebeu ranitidina ($p=0,02$) (tabela 6 e figura 8).

Tabela 6 - Principais medidas para tratamento da sepse implementadas nos grupos placebo (A) e ranitidina (B) nos 7 primeiros dias da internação.

Características	Grupo Placebo (A) 18 pacientes	Grupo Ranitidina (B) 17 pacientes	p
ATB na 1ª hora adm. (sim) ^a	12 (66,6)	11 (64,7)	0,90
Expansão 30mL/Kg adm. (sim) ^a	10 (55,5)	11 (68,7)	0,42
Volume expansão adm. (L) ^c	1 ± 1,3 (0,8-2,1)	1,5 ± 1 (1-2,1)	0,37
Omeprazol (sim) ^a	16 (88,8)	13 (76,4)	0,33
Heparina profilática (sim) ^a	15 (83,3)	15 (82,3)	0,93
Dieta até 48h (sim) ^a	14 (77,7)	14 (82,3)	0,73
SVD nas 1ª ^s 24h para BH (sim) ^a	15 (83,3)	16 (94,1)	0,31
Acesso venoso central (sim) ^a	9 (50)	9 (52,9)	0,86
Noradrenalina nas 1ª ^s 24h (sim) ^a	8 (44,4)	8 (47)	0,87
Dobutamina nas 1ª ^s 24h (sim) ^a	2 (11,1)	1 (5,8)	0,58
VM nas 1ª ^s 24h (sim) ^a	5 (27,7)	6 (35,2)	0,63
Ajuste ATB por cultura (sim) ^a	7 (38,8)	5 (29,4)	0,55
Glicemia média nos 7 dias > 180mg/dL (sim) ^a	7 (38,8)	11 (64,7)	0,12
Glicemia média nos 7 dias (mg/dL) ^c	161 ± 67 (149-216)	209 ± 52 (180-234)	0,15
Glicemia média por dia (mg/dL)			
d0 ^b	187 ± 70,6	227 ± 68,4	0,09
d1 ^c	162 ± 89,3 (150-239)	208 ± 71,6 (177-251)	0,32
d2 ^c	177 ± 97,7 (147-244)	176 ± 68,7 (167-238)	0,57
d3 ^b	175 ± 80,2	199 ± 69,3	0,35
d4 ^b	187 ± 85,8	207 ± 56,2	0,44
d5 ^b	172 ± 63,2	222 ± 57,3	0,02
d6 ^b	172 ± 75,7	218 ± 69,0	0,09
d7 ^b	164 ± 69,6	214 ± 71,9	0,07

SVD = sonda vesical de demora; BH = balanço hídrico; ATB = antibiótico; adm = admissão; VM = ventilação mecânica; ^a valor expresso em número de pacientes (%); ^b valores expressos em média ± desvio padrão; ^c valores expressos em mediana ± desvio padrão (IC 95%).

Figura 8 - Controle glicêmico dos pacientes nos 7 primeiros dias de internação (* p < 0,05).

Em relação ao uso da ranitidina ou do placebo, a administração foi adequada, sem intercorrências ou perda do cegamento, sendo que houve perda de, no máximo, 4 doses durante os 7 dias de intervenção. Comparando-se os grupos, não houve diferença significativa na quantidade de doses perdidas. Constatou-se que houve média de 0,91 perdas por paciente, com 1,05 no grupo A (placebo) e 0,76 no grupo B (ranitidina). Sobre eventos adversos à ranitidina ou ao placebo, nenhum paciente teve queixa ou alteração que fosse atribuída à medicação, não ocorrendo suspensão em nenhum paciente.

A média do tempo de internação foi de 18,4 dias, sendo que não houve diferença significativa entre os grupos. Nos sete primeiros dias de internação, não houve complicações significativas. Já durante toda internação, as complicações principais foram: 5 pneumonias hospitalares, 5 infecções relacionadas a sonda vesical de demora, 5 úlceras com necessidade de desbridamento ou troca de antibiótico, 4 infecções relacionadas a cateter, 4 trocas de antibiótico por piora clínica ou risco de infecção hospitalar e 2 sangramentos gastrointestinais (cuja endoscopia não mostrou sangramento ativo e hemoglobina estabilizou após transfusão). A tabela 7 demonstra as complicações observadas em cada grupo, as quais não foram significativas.

Tabela 7 - Número de complicações hospitalar

Complicação	Grupo Placebo (A)	Grupo Ranitidina (B)	Total
Pneumonia hospitalar	3	2	5
Infecção relacionada a SVD	2	3	5
Úlcera com desbridamento	2	3	5
Infecção relacionada a cateter	2	2	4
Troca de antibiótico por piora clínica	1	3	4
Sangramento gastrointestinal	1	1	2
Soma de todas complicações	11	14	25

SVD = sonda vesical de demora

Em relação aos principais desfechos clínicos (SOFA e mortalidade), inicialmente os pacientes foram analisados de acordo com o grupo randomizado (grupos A - Placebo e B - Ranitidina). Após, os pacientes foram subdivididos em sepse grave e choque séptico.

Nas figuras 9 e 10 encontram-se os escores de SOFA nos dias D0, D2 e D7 dos grupos placebo e ranitidina e dos subgrupos sepse grave e choque séptico. Não houve diferença significativa entre os grupos nos três dias avaliados ($p > 0,05$). Quando se analisou separadamente pacientes com sepse e choque séptico, também não se observou diferença significativa.

Figura 9 - Escores de SOFA na admissão, no D2 e no D7 nos grupos A - Placebo e B - Ranitidina ($p > 0,05$).

Figura 10 - Escores de SOFA dos pacientes com sepse grave e choque séptico na admissão, no D2 e no D7 nos grupos A - Placebo e B - Ranitidina ($p > 0,05$).

Em relação a mortalidade hospitalar, a figura 11 demonstra como se comportou nos 2 grupos completos, e nas diferentes gravidades (choque séptico e sepse grave). Todas as comparações não apresentaram diferença significativa.

Figura 11 - Mortalidade nos grupos A (placebo) e B (ranitidina) e de acordo com a classificação (sepse e choque séptico).

Considerando que em um dos trabalhos que motivou esse projeto (Carlos *et al.*, 2013), os camundongos avaliados não recebiam tratamento para o diabetes, optou-se por realizar as mesmas avaliações de mortalidade e de SOFA em pacientes com diabetes descontrolada. Assim, os pacientes foram subdivididos em DM cronicamente descontrolada (Hb glicada > 7%) e glicemia não controlada na internação (glicemia média nos 7 dias > 180mg/dL). A tabela 8 apresenta as comparações desses subgrupos, as quais não apresentaram diferença significativa, exceto pelo SOFA da admissão dos pacientes com choque séptico e Hb glicada > 7%, os quais evidenciaram média do SOFA de 13 no grupo ranitidina e 8,2 no placebo (p = 0,04). Ainda que não tenha atingido significância estatística, em pacientes com diabetes descontrolada, o grupo da ranitidina apresentou 5 óbitos, enquanto que o placebo apenas 1 (tabela 8).

Tabela 8 - Variação do SOFA nos dias D0, D2 e D7, e da mortalidade nos subgrupos de pacientes com diabetes descontrolada, conforme o grupo A (placebo) ou B (ranitidina), bem como sua gravidade (choque séptico ou sepse grave).

Características	Grupo Placebo (A)	Grupo Ranitidina (B)	P
Todos pacientes com hemoglobina glicada > 7%			
SOFA d0 ^c	6 ± 3,2 (4,1-8,4) / n = 11	6 ± 5,1 (4,9-10,9) / n = 14	0,63
SOFA d2 ^c	4 ± 2,8 (2,6-6,4) / n = 11	4 ± 5,5 (3,0-9,4) / n = 14	0,74
SOFA d7 ^c	2 ± 3,0 (1,6-5,7) / n = 10	2,5 ± 5,6 (1,7-8,2) / n = 10	0,93
Óbitos ^a	1 (9,09) / n = 11	5 (35,7) / n = 14	0,12
Sepse Grave com hemoglobina glicada > 7%			
SOFA d0 ^b	4,6 ± 2,0 / n = 6	4,1 ± 1,5 / n = 8	0,58
SOFA d2 ^b	3,6 ± 2,3 / n = 6	2,8 ± 1,8 / n = 8	0,48
SOFA d7 ^c	2 ± 2,1 (0,5-5,0) / n = 5	2 ± 1,8 (0,6-3,6) / n = 6	0,63
Óbitos ^a	0 / n = 6	1 (12,5) / n = 8	0,36
Choque Séptico com hemoglobina glicada > 7%			
SOFA d0 ^b	8,2 ± 3,4 / n = 5	13 ± 3,4 / n = 6	0,04
SOFA d2 ^b	5,6 ± 3,3 / n = 5	10,6 ± 5,8 / n = 6	0,12
SOFA d7 ^b	4,8 ± 3,8 / n = 5	8,8 ± 6,9 / n = 4	0,27
Óbitos ^a	1 (20) / n = 5	4 (66,6) / n = 6	0,12
Todos pacientes com glicemia média nos 7 primeiros dias de internação > 180mg/dL			
SOFA d0 ^b	6 ± 2,8 / n = 7	8,4 ± 5,5 / n = 11	0,29
SOFA d2 ^b	4,2 ± 2,2 / n = 7	7,0 ± 5,8 / n = 11	0,24
SOFA d7 ^c	2 ± 3,2 (1,0-6,9) / n = 6	4 ± 6,0 (1,9-10) / n = 8	0,61
Óbitos ^a	1 (14,29) / n = 7	5 (45,45) / n = 11	0,17
Sepse Grave com glicemia média nos 7 primeiros dias de internação > 180mg/dL			
SOFA d0 ^b	4,8 ± 2,2 / n = 5	4,0 ± 1,4 / n = 5	0,52
SOFA d2 ^b	3,8 ± 2,5 / n = 5	2,6 ± 1,6 / n = 5	0,40
SOFA d7 ^b	3,2 ± 2,1 / n = 4	2,6 ± 2,1 / n = 4	0,67
Óbitos ^a	0 / n = 5	1 (20) / n = 5	0,29
Choque Séptico com glicemia média nos 7 primeiros dias de internação > 180mg/dL			
SOFA d0 ^b	9 ± 1,4 / n = 2	12,1 ± 4,8 / n = 6	0,42
SOFA d2 ^b	5,5 ± 0,7 / n = 2	10,8 ± 5,4 / n = 6	0,23
SOFA d7 ^b	6 ± 5,6 / n = 2	8,8 ± 5,9 / n = 4	0,62
Óbitos ^a	1 (50) / n = 2	4 (66,67) / n = 6	0,67

n = número de pacientes avaliados; SOFA = Sepsis-related Organ Failure Assessment; ^a valor expresso em número de pacientes (%); ^b valores expressos em média ± desvio padrão; ^c valores expressos em mediana ± desvio padrão (IC 95%).

Como o total de óbitos foram 10 pacientes, sendo 5 em cada grupo (figura 11), optado por avaliar o controle glicêmico dos pacientes que foram a óbito e comparar com os que receberam alta. A média de glicemia em 7 dias foi 149mg/dL nos pacientes morreram no grupo placebo e 245mg/dL no grupo ranitidina (p = 0,02), conforme ilustrado na figura 12. Também, avaliado SOFA, APACHE e SAPS iniciais nesses 2 subgrupos, sem diferença significativa.

Figura 12 - Controle glicêmico nos óbitos e altas nos grupos ranitidina e placebo (* $p < 0,05$).

Para avaliar se a diferença encontrada pode ter interferido na mortalidade, foi comparada a glicemia média nos 7 dias entre óbito e não óbito dentro do mesmo grupo. Os dados estão apresentados na figura 13. No grupo placebo, a média das glicemias foi 195mg/dL nos pacientes com alta e 149mg/dL nos óbitos ($p = 0,1$); naqueles que foram tratados com ranitidina, a média foi 191mg/dL nos pacientes com alta e 245mg/dL nos óbitos ($p = 0,04$).

Figura 13 - Controle glicêmico dos pacientes com óbito e alta dentro de um mesmo grupo.

Por fim, outros desfechos clínicos avaliados foram a necessidade de ventilação mecânica, o tempo de uso de ventilação mecânica, o uso de droga vasoativa, o tempo de uso de droga vasoativa, a necessidade de terapia renal substitutiva e o tempo de internação. Conforme demonstra a tabela 9, não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Tabela 9 - Desfechos clínicos nos grupos A (placebo) e B (ranitidina).

Características	Grupo Placebo (A) 18 pacientes	Grupo Ranitidina (B) 17 pacientes	P
Desfechos até sétimo dia de internação (d7)			
Sobrevida até D7 (sim) ^a	18 (100)	16 (94,1)	0,29
Necessidade de VM ^a	5 (27,7)	6 (35,2)	0,63
Dias com VM ^c	7 ± 1,9 (3,1-8,0)	7 ± 1,6 (4,4-7,8)	0,75
Necessidade de DVA ^a	9 (50,0)	8 (47,06)	0,86
Dias com DVA ^b	3 ± 2,1	4 ± 2,7	0,41
Necessidade de TRS ^a	3 (16,6)	4 (23,5)	0,61
Desfechos durante toda a internação			
Necessidade de VM ^a	7 (38,8)	8 (47,06)	0,62
Necessidade de DVA ^a	10 (55,5)	9 (52,9)	0,87
Necessidade de TRS ^a	3 (16,6)	5 (29,4)	0,36
Tempo internação (dias)			
Todos dos pacientes ^c	16,5 ± 17 (11,5-28,5)	10 ± 16 (8,4-24,8)	0,26
Pacientes com alta ^c	16 ± 19,7 (8,6-32,5)	9,5 ± 16 (3,8-24,2)	0,17
Pacientes com óbito ^b	18,6 ± 8,4	22,8 ± 15,8	0,61

VM = ventilação mecânica; DVA = droga vasoativa; TRS = terapia renal substitutiva; ^a valor expresso em número de pacientes (%); ^b valores expressos em média ± desvio padrão; ^c valores expressos em mediana ± desvio padrão (IC 95%).

4.4 Avaliação da expressão de CXCR2

Como a avaliação do CXCR2 depende do controle utilizado, inicialmente foram comparados os controles saudáveis nos dois grupos e, após, os pacientes incluídos no estudo. Para isso, a quantificação do CXCR2 foi realizada pela intensidade de imunofluorescência (MFI) e pela porcentagem de expressão.

4.4.1 Comparação dos controles

Não se observou diferença significativa nas características demográficas dos controles utilizados nos grupos placebo e ranitidina. Ainda, a quantificação do CXCR2 também foi homogênea nos controles dos dois grupos (tabela 10).

Tabela 10 - Características demográficas dos controles saudáveis, bem como dados de expressão de CXCR2

Características	Grupo Placebo (A)	Grupo Ranitidina(B)	P
Características demográficas dos controles saudáveis			
Idade ^c	32 ± 4 (31,1-34,8)	36 ± 4,4 (32,5-35,6)	0,40
Sexo (masculino) ^a	15 (71,4)	26 (76,4)	0,67
Peso (Kg) ^c	70 ± 15,8 (68,9-83,3)	77,5 ± 13,8 (64,1-83,7)	0,42
Expressão de CXCR2 por dia de avaliação			
CXCR2 MFI D0 ^c	1661 ± 3096 (1121-5055)	2453 ± 2389 (1222-4259)	0,79
CXCR2 porcentagem D0 ^c	85 ± 23,1 (61,6-91)	85,5 ± 24,6 (62,5-93,9)	0,64
CXCR2 MFI D2 ^c	1625 ± 2586 (1176-4651)	1539 ± 2382 (631-4040)	0,52
CXCR2 porcentagem D2 ^c	91,6 ± 21,9 (64,7-94,2)	95,2 ± 25,8 (61,2-95,9)	0,92
CXCR2 MFI D7 ^c	1802 ± 2690 (1246-4861)	1642 ± 1096 (1156-2841)	0,81
CXCR2 porcentagem D7 ^c	96,3 ± 22,4 (67,6-97,8)	94,1 ± 9,2 (84-98,2)	0,81
Expressão de CXCR2 de todos os controles do estudo			
CXCR2 MFI ^c	1713 ± 2724 (2070-3971)	1772 ± 2052 (1642-3147)	0,69
CXCR2 porcentagem ^c	94,2 ± 21,9 (71,7-87,1)	94,6 ± 22 (74-89,9)	0,79

^a valor expresso em número de pacientes (%); ^b valores expressos em média ± desvio padrão;

^c valores expressos em mediana ± desvio padrão (IC 95%).

4.4.2 Avaliação dos pacientes

Primeiramente, foram avaliadas a intensidade de imunofluorescência do CXCR2 (MFI) e a porcentagem de expressão, comparando todos os pacientes com sepse na admissão com seus respectivos controles. Observamos que os pacientes sépticos expressam significativamente menos CXCR2 do que os indivíduos saudáveis ($p = 0,0063$), porém não foram diferentes em relação a intensidade.

Posteriormente, foi realizada a avaliação da evolução do CXCR2 no D0, D2 e D7 de todos os pacientes incluídos no estudo e daqueles que receberam alta hospitalar (sobreviva). A porcentagem de CXCR2 em todos os pacientes é significativamente menor que seus controles nos 3 dias de avaliação ($p < 0,05$). Já nos pacientes que receberam alta hospitalar, em comparação com seus controles, essa diferença ocorre apenas no D0, sendo que nos dias D2 e D7 os pacientes com sepse aumentaram a expressão de CXCR2, se aproximando dos voluntários saudáveis. Também, pode-se observar que há um aumento significativo da porcentagem de expressão de CXCR2 em pacientes que receberam alta comparando os dias D0 e D7 (figuras 14 e 15). Adicionalmente, comparado a razão D7/D0 no CXCR2 entre óbitos e altas (tabela 11), com valor maior na porcentagem de CXCR2 das altas ($p = 0,03$).

Figura 14 - Expressão de CXCR2 porcentagem e MFI comparando todos os pacientes com sepse e o controle saudável.

Figura 15 - Expressão de CXCR2 em porcentagem e intensidade (MFI) em todos os pacientes e naqueles com alta hospitalar nos dias D0, D2 e D7. Os pacientes com sepse foram comparados com seus respectivos controles (* $p < 0,05$).

Tabela 11 – Relação do aumento de CXCR2 entre admissão e D7 (razão D7/D0) e mortalidade.

Desfecho	ALTA	ÓBITO	P
Porcentagem CXCR2 D7/D0 ^c	2,2 ± 10 (-0,2-11,8)	1 ± 0,8 (0,3-2,2)	0,03
MFI CXCR2 D7/D0 ^b	1,4 ± 0,8	0,9 ± 0,72	0,31

Expressão dos valores: ^b média ± desvio padrão; ^c mediana ± desvio padrão (IC 95%).

Adicionalmente, quantificação de CXCR2 foi comparada nos grupos ranitidina e placebo de todos os pacientes e nos subgrupos de pacientes com sepse grave, choque séptico e nos que obtiveram alta hospitalar (figura 16).

Foram realizadas as comparações das evoluções da expressão do CXCR2 dos dias D0 a D2, D0 a D7 e D2 a D7 dentro de um mesmo grupo. Também, foram comparados os resultados de porcentagem expressão do CXCR2 entre grupo placebo e ranitidina nos dias D0, D2 e D7.

Sobre as evoluções da expressão de CXCR2 ao longo dos dias, a diferença mais próxima de ser significativa foi no grupo de pacientes com sepse grave que receberam ranitidina, com $p = 0,07$ de D0 a D7 e $p = 0,07$ de D2 a D7. Todas as demais comparações obtiveram $p \geq 0,1$.

Em relação às comparações dos valores de CXCR2 nos grupos ranitidina e placebo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$)

Figura 16 - Comparação da expressão de CXCR2 nos grupos ranitidina e placebo.

Por fim, como na maioria dos casos houve aumento da expressão de CXCR2, foi optado por quantificar esse aumento em cada grupo. Assim, feita divisão da

porcentagem de CXCR2 do D7 pelo D0. Não houve diferença significativa em nenhum dos achados nos grupos placebo e ranitidina (tabela 12).

Tabela 12 – Comparação do aumento de CXCR2 entre admissão e sétimo dia (D7/D0) nos grupos placebo e ranitidina.

Pacientes avaliados	Grupo Placebo (A)	Grupo Ranitidina (B)	P
Todos pacientes ^c	1,5 ± 4 (0,07-5,4) / n = 11	2,3 ± 12,3 (-3,6-16,9) / n = 8	0,36
Pacientes com alta hospitalar ^c	1,9 ± 4,8 (-0,8-8,1) / n = 7	2,4 ± 14 (-6,4-23,1) / n = 6	0,31
Sepse grave ^c	1,5 ± 1 (-0,1-3,3) / n = 4	2,3 ± 15,4 (-9,6-28,6) / n = 5	0,22
Choque séptico ^c	1,5 ± 4,9 (-1,1-8) / n = 7	1,8 ± 0,8 (-0,3-4) / n = 3	0,90

n = número de pacientes avaliados; ^c valores expressos em mediana ± desvio padrão (IC 95%).

4.5 Avaliação dos níveis de IL-6, IL-8, ST-2 e NETs

Inicialmente foram analisados todos os controles saudáveis do estudo quanto aos níveis de IL-6, IL-8, ST2 e NETs. Em relação aos pacientes, as citocinas foram avaliadas no D0, D2 e D7 no total de pacientes, bem como nos subgrupos de pacientes com alta hospitalar, sepse grave e choque séptico. Os dados estão na tabela 13.

Em resumo, comparando os 2 grupos com todos os pacientes, indivíduos que receberam ranitidina apresentaram níveis significativamente mais baixo de IL6 no D2 e de ST2 no D7.

Também, quando comparado com quem recebeu placebo, pacientes com sepse grave que receberam ranitidina tiveram níveis significativamente menores de IL-6 no D2 e no D7 e NETs no D7; pacientes com choque séptico que receberam ranitidina tiveram níveis significativamente menores de ST2 na admissão; pacientes que receberam alta e receberam ranitidina tiveram significativamente níveis menores de IL-6 no D2 e D7 e ST2 no D7 (tabela 13 e figuras 17).

Pacientes com alta hospitalar obtiveram diferença significativa na redução dos níveis de IL-6 entre D0 e D7 em ambos os grupos, sendo que ao comparar D7 de ranitidina e placebo, também há maior redução na ranitidina ($p < 0,05$). Já nos óbitos, essas diferenças não são significativas (figura 18).

Foi observado que no D7 indivíduos com óbito apresentaram níveis de ST2 e NETs significativamente mais elevados do que àqueles que receberam alta. Além disso, os níveis de ST2 e NETs foram significativamente mais baixos no grupo que recebeu ranitidina com comparação com o placebo (figura 19).

Tabela 13 - Resultado de IL-6, IL-8, ST-2 e NETs conforme grupo e subgrupo

Características	Grupo Placebo (A)	Grupo Ranitidina (B)	P
Controles saudáveis			
IL-6 ^d	8,13 ± 336,7		
IL-8 ^d	19,2 ± 312,8		
ST2 ^d	345,16 ± 795,5		
NETs ^d	3,46 ± 1,17		
Todos os pacientes n = 14 adm. / 14 D2 / 11 D7 n = 14 adm. / 13 D2 / 9 D7			
IL-6 na adm. ^c	231,2 ± 279,1 (138,2-513,3)	153,3 ± 481 (-21,7-666,5)	0,34
IL-8 na adm. ^c	52,3 ± 113,9 (20,8-173,9)	29,9 ± 100,8 (-23,2-264)	0,83
ST2 na adm. ^b	1246 ± 397,1	1028,2 ± 709,2	0,39
NETs na adm. ^c	6,2 ± 1 (5,6-6,8)	5,4 ± 1,2 (5,1-6,6)	0,14
IL-6 no D2 ^c	118,7 ± 263,2 (45,9-350)	21,2 ± 458,1 (-105,2-448,5)	0,04
IL-8 no D2 ^c	57,8 ± 73,4 (31,8-116,5)	36,1 ± 132,6 (-11,4-148,9)	0,43
ST2 no D2 ^c	859,3 ± 524,6 (771,5-1377,4)	844,6 ± 429,8 (584,9-1104,4)	0,33
NETs no D2 ^c	5,4 ± 0,8 (5,2-6,1)	5,1 ± 1,1 (4,8-6,2)	0,43
IL-6 no D7 ^c	49,8 ± 1041 (-299,9-1098,8)	8 ± 122,8 (-33,3-155,4)	0,06
IL-8 no D7 ^c	29,9 ± 990,1 (-260,2-1070,1)	28,7 ± 19,9 (13,4-44,1)	0,23
ST2 no D7 ^c	772,4 ± 497,2 (438,3-1106,4)	324,1 ± 230,9 (146,6-501,6)	0,02
NETs no D7 ^b	5,5 ± 0,63	5,2 ± 0,84	0,42
Alta hospitalar n = 11 adm. / 11 D2 / 8 D7 n = 10 adm. / 9 D2 / 7 D7			
IL-6 na adm. ^c	286,4 ± 246,9 (109,7-463)	107,7 ± 226,6 (-8,5-370,3)	0,32
IL-8 na adm. ^c	59,3 ± 92,2 (26,1-158,1)	28 ± 99,5 (-13,1-153,2)	0,53
ST2 na adm. ^b	1247,6 ± 426,5	963,9 ± 796,8	0,34
NETs na adm. ^c	6,2 ± 1 (5,4-6,9)	5,4 ± 1,4 (5-7,1)	0,43
IL-6 no D2 ^c	126,6 ± 283,6 (23-404,1)	9,6 ± 61,8 (-5,2-89,7)	0,008
IL-8 no D2 ^c	66 ± 80,8 (26,3-134,9)	31,3 ± 20,8 (15,3-47,4)	0,23
ST2 no D2 ^b	1131,7 ± 582,3	804,6 ± 477	0,19
NETs no D2 ^b	5,7 ± 0,78	5,2 ± 0,94	0,20
IL-6 no D7 ^c	100,3 ± 107,5 (10,3-190,2)	1,4 ± 27,7 (-11-40,3)	0,01
IL-8 no D7 ^c	27,4 ± 1159,2 (-533,2-1405)	22,9 ± 18,3 (5,9-39,9)	0,29
ST2 no D7 ^b	555,1 ± 309,1	276,8 ± 183,3	0,05
NETs no D7 ^b	5,4 ± 0,45	5,0 ± 0,57	0,14
Sepse grave n = 10 adm. / 10 D2 / 7 D7 n = 8 adm. / 7 D2 / 5 D7			
IL-6 na adm. ^c	286,4 ± 246,9 (109,7-463)	107,7 ± 226,6 (-8,5-370,3)	0,32
IL-8 na adm. ^c	59,3 ± 92,2 (26,1-158,1)	28 ± 99,5 (-13,1-153,2)	0,53
ST2 na adm. ^b	1247,6 ± 426,5	963,9 ± 796,8	0,34
NETs na adm. ^c	6 ± 1 (5,4-6,9)	5,4 ± 1,6 (5-7,1)	0,47
IL-6 no D2 ^c	118,7 ± 302,9 (12,7-446,1)	9,6 ± 30 (0,2-55,7)	0,01
IL-8 no D2 ^c	57,8 ± 82,6 (18,7-136,9)	26,6 ± 20,3 (7,7-45,4)	0,24
ST2 no D2 ^b	931,5 ± 344,7	806,3 ± 513,5	0,55
NETs no D2 ^c	5,4 ± 0,7 (5,1-6,2)	5,1 ± 0,8 (4,6-6,3)	0,55
IL-6 no D7 ^c	92,3 ± 1306 (-640,6-1775)	1,4 ± 14,8 (-24-58,1)	0,01
IL-8 no D7 ^c	29,9 ± 297,7 (-133,2-417,5)	15,1 ± 10,3 (7,6-33,3)	0,16
ST2 no D7 ^b	663 ± 491,4	214,4 ± 152	0,07
NETs no D7 ^b	5,7 ± 0,52	4,7 ± 0,39	0,003

Características	Grupo Placebo (A)	Grupo Ranitidina (B)	P
Choque séptico	n = 4 adm. / 4 D2 / 4 D7	n = 6 adm. / 6 D2 / 4 D7	
IL-6 na adm. ^c	309,3 ± 374,1 (-286-904,7)	289,1 ± 1648,8 (-656,2-2804,5)	0,39
IL-8 na adm. ^c	148,7 ± 143,4 (-79,5-376,9)	56,4 ± 354,1 (-108,3-634,8)	0,83
ST2 na adm. ^b	1337,6 ± 215,5	1050,3 ± 168,6	0,04
NETs na adm. ^b	6,3 ± 1,1	5,4 ± 0,42	0,11
IL-6 no D2 ^c	119,3 ± 116 (-65,2-303,9)	69,2 ± 663,4 (-357-1035,4)	0,52
IL-8 no D2 ^c	65 ± 52,2 (-18-148,1)	43,5 ± 190,6 (-82,2-318)	1,0
ST2 no D2 ^b	1431,7 ± 773,3	889,3 ± 350,2	0,16
NETs no D2 ^b	5,6 ± 0,98	5,5 ± 1,51	0,89
IL-6 no D7 ^c	47,3 ± 145,2 (-125,2-337)	115,9 ± 177,5 (-166,6-398,5)	1,0
IL-8 no D7 ^c	70,3 ± 1627,2 (-1724,5-3454)	39,1 ± 25,6 (-1,7-80)	0,56
ST2 no D7 ^c	963,8 ± 514,3 (145,4-1782,2)	461,3 ± 257,3 (51,8-870,8)	0,08
NETs no D7 ^b	5,1 ± 0,66	5,9 ± 0,74	0,15

n = número de pacientes avaliados; adm = admissão; ^b valores expressos em média ± desvio padrão; ^c valores expressos em mediana ± desvio padrão (IC 95%); ^d mediana ± desvio padrão

Figura 17 - Citocinas nos grupos ranitidina e placebo com diferença significativa.

Figura 18 – IL-6 nos pacientes com alta e óbito nos grupos ranitidina e placebo (* $p < 0,05$).

Figura 19 – Comparação do dia 7 (D7) dos grupos placebo e ranitidina em relação ao ST2 de todos os pacientes e NETs dos indivíduos com sepse grave. Avaliação de correlação entre desfecho morte e valor de ST2 e NETs no D7 (* $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Inclusão, dados clínicos iniciais e manejo dos pacientes

O presente estudo teve uma inclusão adequada, sendo as características demográficas e clínicas compatíveis com os dados de pacientes sépticos descritos em estudos nacionais. O estudo SPREAD avaliou 2.632 pacientes sépticos e demonstrou que pacientes com sepse tinham uma idade média de aproximadamente 65 anos, que o foco pulmonar era o mais frequente (61%) e escore médio de SOFA de 8 (Machado *et al.*, 2017). Esses dados são muitos semelhantes aos encontrados em nosso estudo (idade média de 55 anos, predomínio de foco pulmonar e média de SOFA 7,8), o que demonstra que a população do nosso estudo tem características compatíveis com os dados brasileiros.

Em relação ao diagnóstico de sepse, todos os pacientes que participaram do estudo apresentaram pelo menos 2 critérios de SIRS, sendo estes suspeitos de serem secundário à infecção. Assim, ficou caracterizado sepse pelos critérios do *Surviving Sepsis Campaign 2012* (Dellinger *et al.*, 2013), sendo que esses critérios estavam vigentes quando foi iniciado o presente estudo. Porém, como desde 2016, após a publicação do Sepsis-3 (Singer *et al.*, 2016), os critérios diagnósticos foram alterados sendo considerado sepse um aumento de 2 pontos no escore SOFA, nós reclassificamos os pacientes desse estudo de acordo com os critérios mais atuais. Apenas 1 paciente teve o escore SOFA menor do que 2, sendo que esse foi caracterizado como sepse grave por ter aumento no lactato, o que faz com que este paciente esteja enquadrado nas condições aceitas como disfunção orgânica pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) (Machado *et al.*, 2016). Portanto, consideramos que os pacientes incluídos em nosso estudo possuíam o diagnóstico de sepse, independente do critério adotado. Em relação ao choque séptico, todos foram não responsivos a volume, com necessidade de droga vasoativa, sendo adequado para os critérios novos e antigos.

As características demográficas basais dos grupos placebo e ranitidina foram semelhantes, sendo considerada a randomização inicial adequada. Também, o estudo

foi cego e não interferiu na conduta em relação à sepse feita por médicos assistentes da UE-FMRP-USP, os quais não sabiam qual grupo o paciente se encontrava. Assim, foi realizado tratamento conforme protocolo vigente na instituição, de maneira semelhante em ambos os grupos. As condutas clínicas no manejo da sepse, como administração de antibiótico na primeira hora, expansão volêmica com 30ml/Kg entre outras, foram semelhantes nos dois grupos.

Um aspecto que merece destaque é o controle glicêmico desses pacientes. A glicemia média diária nos 7 primeiros dias de internação foi ligeiramente maior no grupo ranitidina, no entanto não atingiu significância estatística. Ao avaliar os 7 dias separadamente, foi observado diferença significativa apenas no quinto dia, sendo o maior valor nos pacientes que receberam ranitidina. Apesar do controle glicêmico influenciar na mortalidade (Fabbri *et al.*, 2020; Stoudt *et al.*, 2019), como essa diferença foi significativa em apenas um dia, consideramos pouco provável que ela possa ter interferido nos demais desfechos.

No entanto, ao analisar o controle glicêmico nos pacientes com óbito (5 em cada grupo) e com alta hospitalar (13 no grupo placebo e 12 na ranitidina), evidenciamos uma diferença significativa no controle glicêmico dos pacientes com óbito, sendo a glicemia média de 149mg/dL no grupo placebo e 245mg/dL no grupo ranitidina ($p = 0,02$).

A razão dessa glicemia estar um pouco mais elevada provavelmente é multifatorial. O perfil demográfico e os cuidados entre os pacientes não apresentaram diferenças significativas. No entanto, por serem poucos pacientes, alguns fatores, ou a associação deles, podem ter influenciado para a dificuldade desse controle. Um deles é a presença de 4 pacientes (80%) com choque séptico no grupo ranitidina e 3 (60%) no grupo placebo, pois é conhecido que a gravidade da sepse tem efeito sobre a variabilidade da glicemia (Hirasawa *et al.*, 2009). Outro aspecto é que a hemoglobina glicada estava mais elevada nos pacientes que receberam ranitidina, com média de 8,6 nesse grupo e 7,5 no placebo. Por fim, quatro pacientes com DM insulino dependente foram randomizados para o grupo ranitidina e apenas um para o grupo placebo, o que pode representar maior dificuldade para controle glicêmico.

Ainda, avaliando a possibilidade da ranitidina ter alterado a glicemia, estudos prévios já avaliaram o comportamento de anti-H2 e não observaram influência na glicemia (Grund *et al.*, 1980; Clark *et al.*, 1982). Além disso, os pacientes que receberam ranitidina e foram de alta mantiveram controle glicêmico mais próximo do adequado, com média de 191mg/dL, o que corrobora com nossa hipótese de que a ranitidina não interferiu no controle glicêmico.

Assim, ainda que inicialmente a divisão dos grupos foi adequada, foi observada maior glicemia nos pacientes com óbito do grupo ranitidina, o que pode ter interferido no desfecho desse grupo.

5.2 Desfechos clínicos

Em relação aos desfechos clínicos, inicialmente foi avaliado o escore SOFA nos dias D0, D2 e D7, e não houve diferença significativa entre os dois grupos (placebo e ranitidina), tanto no total de pacientes, quanto nos subgrupos com sepse grave ou choque séptico. Em nosso estudo, o tempo de internação foi em média 16 dias, sendo de 18 dias para pacientes com óbito. Assim, provavelmente as mortes ocorreram numa fase mais tardia da sepse, onde se observa imunossupressão após uma melhora inicial (Boomer *et al.*, 2011).

Em relação à mortalidade, foram observados 5 óbitos em cada grupo. Desses, ao selecionarmos apenas os pacientes com diabetes cronicamente descontrolada (hb glicada > 7% e glicemia média nos 7 dias de internação > 180mg/dL), passou-se a observar 1 óbito no grupo placebo e 4 na ranitidina ($p > 0,05$). Ao se avaliar a mortalidade separadamente em sepse grave ou choque séptico nesse subgrupo de pacientes, também observamos diferença significativa.

Conforme já descrito, o valor da glicemia ficou mais elevado nos pacientes que foram a óbito do grupo que recebeu ranitidina. Então, buscando-se avaliar se essa diferença pode ter interferido na mortalidade, foi comparada a glicemia média entre os sobreviventes e os óbitos nos dois grupos. Apenas nos pacientes tratados com ranitidina, a média das glicemias foi maior nos pacientes que foram a óbito, em comparação com os sobreviventes ($p < 0,05$). Assim, é possível que o não controle

glicêmico no grupo ranitidina possa ter interferido nos pacientes que evoluíram a óbito.

Diversos estudos recomendam que se deve manter glicemias menores que 180mg/dL e evitar controles muito estrito (Rhodes *et al.*, 2017; Font *et al.*, 2020; Ling *et al.*, 2012; Finfer *et al.*, 2009). Revisões e meta-análises sugerem que há evidências de que hiperglicemia, hipoglicemia ou grandes variações da glicose aumentam risco de mortalidade (Yao *et al.*, 2020; Stoudt *et al.*, 2019). Alguns, inclusive, sugerem um controle de glicemia mais estrito do que os 180mg/dL recomendados (Yao *et al.*, 2020). O valor ótimo de glicemia ainda é controverso, no entanto, a recomendação pela maioria das organizações é uma meta glicêmica entre 140 e 180mg/dL no paciente crítico (Stoudt *et al.*, 2019). Como a hiperglicemia aumenta o risco de mortalidade (Fabbri *et al.*, 2020) e os pacientes do grupo ranitidina mantiveram glicose acima dos valores sugeridos pelas recomendações, consideramos que esse fato possa ter interferido negativamente no desfecho do grupo ranitidina, mesmo não atingindo diferença significativa no grupo como um todo.

5.3 Expressão de CXCR2 em neutrófilos

Estudos prévios em animais descreveram que na sepse a expressão de CXCR2 é menor do que controles saudáveis (Rios-Santos *et al.*, 2007; Tikhonov *et al.*, 2001), existindo, inclusive, evidências de que no paciente com diabetes mellitus essa diferença é ainda maior do que nos indivíduos sépticos sem essa comorbidade (Carlos *et al.*, 2013). Estudos em humanos também observaram diferenças semelhantes na expressão de CXCR2 na sepse (Cummings *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2014; Googman *et al.*, 1999). Ainda, já foi identificado em humanos que pacientes com sepse que tem alta hospitalar apresentam um aumento significativo da expressão de CXCR2 entre a admissão e o sétimo dia de internação (Silva *et al.*, 2014). Além disso, um estudo de avaliação genética de pacientes sépticos identificou que indivíduo com alelo T de CXCR2 possuem maior predisposição para choque séptico (Cardoso *et al.*, 2015).

Considerando que a expressão de CXCR2 é muito variada, podendo ser influenciada pelo citômetro, marcador utilizado, leitura dos dados e outros fatores,

foi optado, inicialmente, por avaliar 2 medidas de CXCR2, sendo elas a porcentagem de neutrófilos com CXCR2 expresso e a intensidade de fluorescência média (MFI).

Cummings *et al.* (1999) avaliaram 14 pacientes sépticos e 8 controles saudáveis, identificando MFI de CXCR2 de 11,84 na sepse, o que representou um valor aproximadamente 50% menor do que os controles saudáveis. Silva *et al.* (2014), estudaram 40 voluntários e 77 pacientes sépticos e encontraram intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de CXCR2 de 73,74 na sepse, valor 50,9% menor que nos saudáveis. Em nosso estudo, a porcentagem de CXCR2 foi em média 51% nos pacientes sépticos, estando 40% menor do que nos controles ($p = 0,0063$). Já a quantificação de MFI em pacientes estava 25% abaixo da dos controles ($p = 0,13$).

Em um outro estudo, Chishti *et al.* (2004), estudaram 15 pacientes sépticos e 8 voluntários, medindo a expressão de CXCR2 em moléculas de fluorocromo equivalentes (MESF) do primeiro ao quinto dia de internação. Eles demonstraram que a expressão de CXCR2 foi menor na sepse do que nos indivíduos controle nos 5 dias. De maneira semelhante, em nosso estudo a porcentagem de CXCR2 em todos os pacientes com sepse foi menor que nos controles na admissão, segundo e sétimo dias. Diferentemente, nós também avaliamos separadamente a evolução da porcentagem de CXCR2 nos indivíduos com alta hospitalar, sendo observado que nesse subgrupo a expressão do CXCR2 está mais baixa na sepse apenas na admissão, mas essa diferença não é vista no segundo e sétimo dias, já que os valores se aproximam. Esse fato provavelmente ocorre devido a melhora clínica associada a aumento da expressão de CXCR2 nos indivíduos sépticos com sobrevida hospitalar. Também, foi avaliado o mesmo dado com MFI de CXCR2, no entanto sem diferença significativa.

De forma complementar, averiguamos a variação da elevação de CXCR2 entre a admissão e o sétimo dia. Comparando-se D0 com D7 de todos os pacientes, não foi encontrada diferença significativa. No entanto, no subgrupo de pacientes com desfecho de alta hospitalar, essa diferença se torna significativa, com aumento de CXCR2 no D7. Esse achado é semelhante ao achado já descrito no estudo de Silva *et al.* (2014). De forma complementar, evidenciamos que a intensidade do aumento da porcentagem de CXCR2 (razão D7/D0) é maior na alta do que no óbito ($p = 0,03$).

Objetivando avaliar se os dados de nosso estudo reproduziam os encontrados em experimentos animais, em que houve aumento da expressão de CXCR2 em camundongos diabéticos que recebem anti-H2 (Carlos *et al.*, 2013), foi feita a comparação dos grupos ranitidina e placebo quanto à porcentagem de CXCR2 em todos pacientes, bem como nos subgrupos de sepse grave, choque séptico e pacientes com alta hospitalar. No entanto, não foi encontrada diferença significativa. Uma das possíveis explicações é que os pacientes em nosso estudo, diferentemente de estudos animais, onde os grupos são mais homogêneos, apresentam outras comorbidades que também podem influenciar na expressão de CXCR2. Outro aspecto que pode ter influenciado é o foco de infecção, que é sempre o mesmo em estudos com camundongos, diferentemente do que ocorre na prática clínica. Por fim, outra explicação, é que o valor que encontramos de CXCR2 é maior e possui mais elevado desvio padrão do que o usado para o cálculo amostral. Assim, o número de pacientes pode ter sido pequeno para se comprovar diferença significativa.

5.4 Níveis de IL-6, IL8, ST2 e NETs

Inicialmente, feito comparação dos níveis de IL-6, IL-8, ST2 e NETs de indivíduos saudáveis com os pacientes sépticos na admissão. As quatro avaliações apresentaram valores mais baixos nos controles saudáveis do que nos pacientes, semelhante à observação do estudo de Hoogerwerf *et al.* (2010) e Yang *et al.* (2017).

Estudos prévios identificaram que níveis mais elevados de IL-6 se correlacionam com maior gravidade e mortalidade na sepse (Remick *et al.*, 2005; Reinhart *et al.*, 2001), podendo, inclusive, apresentar uma certa redução na fase inicial da sepse, com posterior novo aumento antes do óbito na sepse tardia (Xiao *et al.*, 2006). Em um outro estudo, Song *et al.* (2019) avaliaram 28 pacientes com sepse, e encontraram que os níveis IL-6 reduziam significativamente ao longo da internação dos pacientes que tiveram alta hospitalar, diferentemente dos óbitos. De forma similar, em nosso estudo tanto o grupo ranitidina quanto o placebo apresentaram redução de IL-6 no sétimo dia em relação à admissão. No entanto, ao comparar os grupos, a redução no sétimo dia foi mais importante no grupo que recebeu ranitidina, sugerindo maior redução de inflamação nesse grupo.

Ricarte-Bratti *et al.* (2017), avaliaram 48 pacientes com sepse e choque séptico, encontrando redução de IL-6 após 72h de internação nos sobreviventes. Apesar de que em nosso estudo não houve diferença de mortalidade, foram encontrados níveis de IL-6 mais baixos no grupo ranitidina, o que pode indicar um benefício do uso da medicação. É importante ressaltar que nosso estudo não foi desenhado para avaliar mortalidade. Além disso, os níveis de IL-6 também estavam mais baixos no grupo ranitidina no segundo e sétimo dias dos subgrupos de sepse grave e em indivíduos com alta hospitalar. Isso reforça que a ranitidina pode ter auxiliado na redução de inflamação desses pacientes.

Da mesma forma, a concentração de ST2 está correlacionada com prognóstico e gravidade da sepse (Hur et al, 2015), sendo que já se identificou uma elevação dessa citocina por até 14 dias nos pacientes com maior mortalidade (Hoogerwerf *et al.*, 2010). Em nosso estudo, observou-se aumento significativo em relação aos controles na admissão e segundo dia, mas não no sétimo dia, o que pode indicar uma melhora clínica desses pacientes. Em relação à mortalidade, no sétimo dia houve um aumento significativo de ST2 nos pacientes que evoluíram para óbito ao longo da internação. Acrescentando a esse dado, o grupo que recebeu ranitidina apresentou níveis de ST2 significativamente mais baixa no sétimo dia em relação ao grupo placebo, o que pode indicar que a ranitidina causou algum benefício para esses pacientes.

Em relação a IL-8, Chishti *et al.* (2004) avaliaram nos níveis de IL-8 em 15 pacientes com sepse e 8 voluntários saudáveis, encontrando valores maiores nos indivíduos sépticos. De forma semelhante, nosso estudo encontrou IL-8 mais elevada na sepse de maneira significativa. No entanto, os níveis de IL-8 não apresentaram diferença significativa nos grupos placebo e ranitidina.

Sobre NETs, Abrams *et al.* (2019) observaram que valores mais altos de NETs estavam correlacionados com mortalidade. Semelhantemente, em nosso estudo pacientes com sepse grave e valores maiores de NETs apresentaram maior mortalidade. Adicionalmente, comparando-se os pacientes que receberam placebo e ranitidina, observamos que pacientes com sepse grave que receberam ranitidina apresentaram valores significativamente mais baixos de NETs no D7. Há evidências da importância da NETs na patogênese da sepse, com valores mais altos

correlacionando-se com maior disfunção orgânica (Czaikoski *et al.*, 2016). Assim, a ranitidina, ao reduzir as NETs, pode ter tido alguma ação protetora em pacientes com sepse grave.

Por fim, ainda que seja um desfecho secundário, o grupo ranitidina apresentou redução mais importante de IL-6 no D2 e ST2 no D7 de todos os pacientes. Ainda, apresentou valores mais baixos de IL-6, ST2 e NET em subgrupos que receberam ranitidina, como sepse grave e pacientes de alta. Foi feita avaliação do poder desses resultados, encontrando-se 96,8% para NET em sepse grave e 75,8% para ST2 de todos os pacientes no D7. Para os demais resultados, o poder foi abaixo de 70%. Assim, a probabilidade da ranitidina ter reduzido as NETs na sepse grave é alta.

5.5 Complicações hospitalares ou eventos adversos pela ranitidina durante os 7 dias de intervenção

Nos 7 dias de acompanhamento de uso da intervenção não houve complicação ou suspeita de evento adversos secundário ao uso da ranitidina ou do placebo.

Sobre complicações hospitalares, os grupos placebo e ranitidina não apresentaram diferença significativa. Do total de 25 complicações, somando-se os grupos, foram observadas 18 por causas infecciosas, sendo as principais infecções relacionadas a sonda, cateter, pneumonia hospitalar ou troca de antibiótico por piora clínica. Como 4 pacientes apresentaram 2 dessas complicações na mesma internação, um total de 14 pacientes (40%) apresentaram complicação infecciosa. Esse dado se assemelha ao encontrado por Zhao *et al.* (2016), que avaliaram 372 pacientes com sepse, identificando infecção secundária na fase tardia da sepse em 39% dos casos.

Em relação a sangramento gastrointestinal, Barletta *et al.* (2014), compararam inibidor de bomba de prótons e anti-H2 para profilaxia de úlcera de estresse em 686 pacientes sépticos com ventilação mecânica. Foi encontrado sangramento em 9,5% dos pacientes, não se evidenciando diferença significativa entre os grupos. Esse dado é condizente com nossa pesquisa, que ocorreu suspeita de sangramento gastrointestinal em 5% dos pacientes, que representa 13% dos indivíduos com ventilação mecânica.

5.6 Número de pacientes incluídos no estudo

Em relação ao número de pacientes, de acordo com o tamanho da amostra calculado, foram incluídos 22 pacientes com pelo menos 2 coletas de CXCR2. Como esse estudo envolveu uma complexa relação entre a Unidade de Emergência do HCFMRP-USP, localizada no centro de Ribeirão Preto, e o laboratório de pesquisa do prof. Fernando Cunha no campus da USP, não foi possível a realização de todas análises em todos pacientes.

Para o cálculo da nossa amostra, utilizamos dados do estudo de Cummings *et al.*, 1999, o qual obteve expressão de CXCR2 MFI de $11,84 \pm 4,2$. Em nosso estudo encontramos uma expressão de MFI de 1498 ± 1243 e uma porcentagem de CXCR2 de $51,1 \pm 32,5$. Se fôssemos calcular o tamanho amostral baseado na expressão MFI de CXCR2 do nosso estudo, precisaríamos de 116 pacientes para o mesmo aumento esperado de 50% que calculado inicialmente, com alfa 0,05 e poder 90%. Portanto, novos estudos com maior número de pacientes são necessários para avaliar os benefícios da ranitidina em pacientes sépticos.

5.7 Considerações finais

Nossa hipótese inicial era que a expressão do CXCR2 iria aumentar com o uso da ranitidina, protegendo os pacientes da sepse. No entanto, não foi evidenciada diferença significativa na expressão do CXCR2 entre o grupo ranitidina e placebo. Algumas razões podem justificar tal fato, como a dificuldade de se reproduzir um estudo animal em humanos, o número pequeno de pacientes no nosso estudo e a pequena diferença no controle glicêmico entre os grupos.

Da mesma forma, não foi observada diferenças significativas na mortalidade, escore SOFA, entre outros. Vale ressaltar que como esse estudo não foi desenhado para avaliar primariamente esses desfechos, outros estudos, com um maior número de pacientes seriam necessários.

Por outro lado, a redução significativa dos níveis de IL-6, ST2 e NETs no grupo da ranitidina pode indicar que a ranitidina trouxe benefícios para os pacientes sépticos com diabetes.

5.8 Limitações do estudo

Este estudo utilizou dados clínicos e laboratoriais de pacientes admitidos na Unidade de Emergência do HCFMRP em um dado período de inclusão. Partimos do princípio que a data de entrada do paciente no hospital é o início da sepse, porém, este é um ponto de grande variabilidade entre indivíduos, já que algumas pessoas procuram ajuda médica no início dos sintomas enquanto outras demoram mais para chegar ao hospital. Somando-se a isso, para ter tempo de assinar o TCLE e conseguir randomizar os pacientes, incluímos pacientes até 48 horas da admissão. Considerando esse período de 48h mais o tempo em que os pacientes ficaram aguardando para serem regulados, muitos pacientes já haviam recebido antibióticos e outras medidas para manejo da sepse. Nesse sentido, outros estudos com a administração da ranitidina com início mais precoce seriam importantes.

Além disso, o número amostral utilizado pode não ter sido suficiente para representar a grande heterogeneidade da população susceptível à sepse, principalmente no Brasil, onde a variação populacional é muito grande. Por ser um estudo unicêntrico, embora alguns dados estejam próximos da estatística nacional, a amostra é representativa apenas de uma região. Somando-se a isso, a dificuldade de o pesquisador estar sempre presente e a eventual ausência do representante legal, fizeram que alguns pacientes não fossem incluídos, reduzindo a amostra pesquisada.

Outra limitação do nosso estudo foi a inclusão de controles jovens, não pareados em idade com os pacientes. Apesar de não ser uma limitação para comparar os grupos placebo e ranitidina, já que eles obtiveram controles semelhantes, o ideal seriam controles com características mais próximas dos pacientes, o que melhoraria a comparação entre controle e paciente.

Outra limitação do estudo foi o fato de nem sempre ter alguém do laboratório disponível para receber sangue em tempo hábil para avaliar expressão de CXCR2. Para

isso, incluímos alguns pacientes a mais até atingir quantidade de pacientes esperada, sendo que esses pacientes a mais foram realizadas apenas avaliações clínicas.

Também, o cegamento do nosso trabalho envolvia colocar a medicação dentro de uma caixa, mas com a necessidade de preparar a solução antes de administrar. Assim, o cegamento para o enfermeiro que realizou a medicação foi quebrado, o que pode ser uma limitação do estudo. Ainda assim, ressaltamos que o pesquisador, os médicos assistentes, o paciente, as pessoas do laboratório que avaliaram CXCR2 e os indivíduos envolvidos na análise estatística do projeto, todos continuaram cegos para os grupos até a finalização do trabalho.

Por fim, ainda que na literatura não tenha descrição de eventos adversos significativos da ranitidina, em 2020 houve suspensão dessa medicação pela ANVISA (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*) e FDA (*U.S. Food and Drug Administration*). Inicialmente, em 2019, foi suspensa apenas a medicação oral, na qual foi observado aumento de nitrosaminas, substância potencialmente cancerígena (Mahase, E., 2019). Já em 2020, por razão de segurança, todas as formas de apresentação da ranitidina foram retiradas do mercado até que novas avaliações sejam feitas para comprovar melhor controle de tais substâncias (Ryan *et al.*, 2020). Importante comentar que estudos descrevem que a exposição prolongada a nitrosaminas se relacionam com risco de câncer (Loh *et al.*, 2011; White, C.M., 2020). No entanto, os pacientes do nosso estudo usaram ranitidina por apenas 7 dias, o que provavelmente reduz esse risco. Contudo, os resultados do nosso estudo poderão ser aplicados assim que a ranitidina for regularizada. Ainda assim, mesmo enquanto não ocorre regularização, vale ressaltar que o estudo em camundongos diabéticos evidenciou benefício do uso de cimetidina na sepse (Carlos *et al.*, 2013). Em nosso estudo, observamos que esse benefício também ocorre com camundongos que recebem ranitidina. Portanto, é possível que seja um efeito de classe, podendo-se utilizar outras medicações com efeito anti-H2. Para se comprovar tais evidências, mais estudos com outras medicações dessa mesma classe são necessários.

6. CONCLUSÃO

A administração de ranitidina em pacientes com diabetes mellitus sépticos reduziu os níveis de IL-6 e ST2 e não causou efeitos colaterais. Além disso, paciente portadores de diabetes mellitus com sepse grave que receberam ranitidina apresentaram redução nos níveis de NETs. Porém, a ranitidina não alterou a expressão de CXCR2 em neutrófilos. Assim, a ranitidina pode ter um efeito benéfico no tratamento da sepse em paciente com diabetes mellitus, sendo ainda necessário mais estudos com a ranitidina ou com outros anti-H2.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, S. T.; MORTON, B.; ALHAMDI, Y.; ALSABANI, M. *et al.* A Novel Assay for Neutrophil Extracellular Trap Formation Independently Predicts Disseminated Intravascular Coagulation and Mortality in Critically Ill Patients. **Am J Respir Crit Care Med**, 200, n. 7, p. 869-880, 10 2019.
- ALBA-LOUREIRO, T. C.; MUNHOZ, C. D.; MARTINS, J. O.; CERCHIARO, G. A. *et al.* Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. **Braz J Med Biol Res**, 40, n. 8, p. 1037-1044, Aug 2007.
- ALVES-FILHO, J. C.; FREITAS, A.; SOUTO, F. O.; SPILLER, F. *et al.* Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 10, p. 4018-4023, Mar 2009.
- ALVES-FILHO, J. C.; SÔNEGO, F.; SOUTO, F. O.; FREITAS, A. *et al.* Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nat Med**, 16, n. 6, p. 708-712, Jun 2010.
- ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med**, 369, n. 9, p. 840-851, Aug 2013.
- ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med**, 29, n. 7 Suppl, p. S109-116, Jul 2001.
- BARLETTA, J. F. Histamine-2-receptor antagonist administration and gastrointestinal bleeding when used for stress ulcer prophylaxis in patients with severe sepsis or septic shock. **Ann Pharmacother**, 48, n. 10, p. 1276-1281, Oct 2014.
- BEALE, R.; REINHART, K.; BRUNKHORST, F. M.; DOBB, G. *et al.* Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. **Infection**, 37, n. 3, p. 222-232, Jun 2009.
- BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, 101, n. 6, p. 1644-1655, Jun 1992.
- BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, 112, n. 1, p. 235-243, Jul 1997.
- BOOMER, J. S.; TO, K.; CHANG, K. C.; TAKASU, O. *et al.* Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. **JAMA**, 306, n. 23, p. 2594-2605, 2011.

BRANCO, A. C. C. C.; YOSHIKAWA, F. S. Y.; PIETROBON, A. J.; SATO, M. N. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. **Mediators Inflamm**, 2018, p. 9524075, 2018.

CARDOSO, C. P.; DE OLIVEIRA, A. J.; BOTONI, F. A.; REZENDE, I. C. *et al.* Interleukin-10 rs2227307 and CXCR2 rs1126579 polymorphisms modulate the predisposition to septic shock. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 110, n. 4, p. 453-460, Jun 2015.

CAREY, I. M.; CRITCHLEY, J. A.; DEWILDE, S.; HARRIS, T. *et al.* Risk of Infection in Type 1 and Type 2 Diabetes Compared With the General Population: A Matched Cohort Study. **Diabetes Care**, 41, n. 3, p. 513-521, 03 2018.

CARLOS, D. Mast cell degranulation contributes to neutrophil migration failure and susceptibility of diabetic mice to polymicrobial sepsis. **Critical Care**, 13, n. Suppl 3, p. p16, 2009.

CARLOS, D.; SPILLER, F.; SOUTO, F. O.; TREVELIN, S. C. *et al.* Histamine h2 receptor signaling in the pathogenesis of sepsis: studies in a murine diabetes model. **J Immunol**, 191, n. 3, p. 1373-1382, Aug 2013.

CARLOS, D.; SÁ-NUNES, A.; DE PAULA, L.; MATIAS-PERES, C. *et al.* Histamine modulates mast cell degranulation through an indirect mechanism in a model IgE-mediated reaction. **Eur J Immunol**, 36, n. 6, p. 1494-1503, Jun 2006.

CECCONI, M.; EVANS, L.; LEVY, M.; RHODES, A. Sepsis and septic shock. **Lancet**, 392, n. 10141, p. 75-87, 07 2018.

CHISHTI, A. D.; SHENTON, B. K.; KIRBY, J. A.; BAUDOUIN, S. V. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. **Intensive Care Med**, 30, n. 4, p. 605-611, Apr 2004.

CLARK, A. J.; BILOUS, R. W.; KEEN, H. Ranitidine in insulin-dependent diabetes. **Lancet**, 2, n. 8303, p. 883-884, Oct 1982.

COLLEN, M. J.; WIRSHUP, J. F. Ranitidine therapy in patients with idiopathic gastric acid hypersecretion. A prospective study. **Dig Dis Sci**, 40, n. 8, p. 1687-1690, Aug 1995.

CUMMINGS, C. J.; MARTIN, T. R.; FREVERT, C. W.; QUAN, J. M. *et al.* Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. **J Immunol**, 162, n. 4, p. 2341-2346, Feb 1999.

CZAIKOSKI, P. G.; MOTA, J. M.; NASCIMENTO, D. C.; SÔNEGO, F. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. **PLoS One**, 11, n. 2, p. e0148142, 2016.

DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M.; LE GOFF, M. C. *et al.* Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabet Med**, 14, n. 1, p. 29-34, Jan 1997.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; RHODES, A.; ANNANE, D. *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Crit Care Med**, 41, n. 2, p. 580-637, Feb 2013.

DENNING, N. L.; AZIZ, M.; GURIEN, S. D.; WANG, P. DAMPs and NETs in Sepsis. **Front Immunol**, 10, p. 2536, 2019.

EIZIRIK, D. L.; PASQUALI, L.; CNOP, M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. **Nat Rev Endocrinol**, 16, n. 7, p. 349-362, 07 2020.

ESPER, A. M.; MOSS, M.; MARTIN, G. S. The effect of diabetes mellitus on organ dysfunction with sepsis: an epidemiological study. **Crit Care**, 13, n. 1, p. R18, 2009.

FABBRI, A.; MARCHESINI, G.; BENAZZI, B.; MORELLI, A. *et al.* Stress Hyperglycemia and Mortality in Subjects With Diabetes and Sepsis. **Crit Care Explor**, 2, n. 7, p. e0152, Jul 2020.

FINFER, S.; CHITTOCK, D.; LI, Y.; FOSTER, D. *et al.* Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients with traumatic brain injury: long-term follow-up of a subgroup of patients from the NICE-SUGAR study. **Intensive Care Med**, 41, n. 6, p. 1037-1047, Jun 2015.

FONT, M. D.; THYAGARAJAN, B.; KHANNA, A. K. Sepsis and Septic Shock - Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. **Med Clin North Am**, 104, n. 4, p. 573-585, Jul 2020.

GOODMAN, R.; CUMMINGS, C.; FREVERT, C.; QUAN, J. *et al.* Functional significance of CXCR2 downregulation on neutrophils from patients with severe sepsis. **Chest**, 116, n. 1 Suppl, p. 111S-112S, Jul 1999.

GOTTS, J. E.; MATTHAY, M. A. Sepsis: pathophysiology and clinical management. **BMJ**, 353, p. i1585, 05 2016.

GRUND, V. R.; MARTINO, R.; HUNNINGHAKE, D. B. Cimetidine blockade of histamine-induced insulin secretion. **Clin Pharmacol Ther**, 28, n. 3, p. 392-397, Sep 1980.

GYAWALI, B.; RAMAKRISHNA, K.; DHAMOON, A. S. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. **SAGE Open Med**, 7, p. 2050312119835043, 2019.

GÜL, F.; ARSLANTAŞ, M. K.; CİNEL, İ.; KUMAR, A. Changing Definitions of Sepsis. **Turk J Anaesthesiol Reanim**, 45, n. 3, p. 129-138, Jun 2017.

HIRASAWA, H.; ODA, S.; NAKAMURA, M. Blood glucose control in patients with severe sepsis and septic shock. **World J Gastroenterol**, 15, n. 33, p. 4132-4136, Sep 2009.

HOOGERWERF, J. J.; TANCK, M. W.; VAN ZOELLEN, M. A.; WITTEBOLE, X. *et al.* Soluble ST2 plasma concentrations predict mortality in severe sepsis. **Intensive Care Med**, 36, n. 4, p. 630-637, Apr 2010.

HUR, M.; KIM, H.; KIM, H. J.; YANG, H. S. *et al.* Soluble ST2 has a prognostic role in patients with suspected sepsis. **Ann Lab Med**, 35, n. 6, p. 570-577, Nov 2015.

JOHNZON, C. F.; RÖNNBERG, E.; PEJLER, G. The Role of Mast Cells in Bacterial Infection. **Am J Pathol**, 186, n. 1, p. 4-14, Jan 2016.

KANASHIRO, A.; HIROKI, C. H.; DA FONSECA, D. M.; BIRBRAIR, A. *et al.* The role of neutrophils in neuro-immune modulation. **Pharmacol Res**, 151, p. 104580, 01 2020.

KOH, G. C.; PEACOCK, S. J.; VAN DER POLL, T.; WIERSINGA, W. J. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 31, n. 4, p. 379-388, Apr 2012.

LERMAN, Y. V.; KIM, M. Neutrophil migration under normal and sepsis conditions. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, 15, n. 1, p. 19-28, 2015.

LING, Y.; LI, X.; GAO, X. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Eur J Intern Med**, 23, n. 6, p. 564-574, Sep 2012.

LOBO, S. M.; REZENDE, E.; MENDES, C. L.; OLIVEIRA, M. C. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project. **Rev Bras Ter Intensiva**, 31, n. 1, p. 1-4, 2019 2019.

LOH, Y. H.; JAKSZYN, P.; LUBEN, R. N.; MULLIGAN, A. A. *et al.* N-Nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study. **Am J Clin Nutr**, 93, n. 5, p. 1053-1061, May 2011.

MACHADO, F. R.; ASSUNÇÃO, M. S.; CAVALCANTI, A. B.; JAPIASSÚ, A. M. *et al.* Getting a consensus: advantages and disadvantages of Sepsis 3 in the context of middle-income settings. **Rev Bras Ter Intensiva**, 28, n. 4, p. 361-365, 2016 Oct-Dec 2016.

MACHADO, F. R.; CAVALCANTI, A. B.; BOZZA, F. A.; FERREIRA, E. M. *et al.* The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **Lancet Infect Dis**, 17, n. 11, p. 1180-1189, 11 2017.

MACLAREN, R.; KASSEL, L. E.; KISER, T. H.; FISH, D. N. Proton pump inhibitors and histamine-2 receptor antagonists in the intensive care setting: focus on therapeutic

and adverse events. **Expert Opin Drug Saf**, 14, n. 2, p. 269-280, Feb 2015.

MACLAREN, R.; REYNOLDS, P. M.; ALLEN, R. R. Histamine-2 receptor antagonists vs proton pump inhibitors on gastrointestinal tract hemorrhage and infectious complications in the intensive care unit. **JAMA Intern Med**, 174, n. 4, p. 564-574, Apr 2014.

MAHASE, E. Ranitidine: Injection back in stock but all oral supplies in Europe still suspended. **BMJ**, 367, p. l7071, Dec 2019.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, 348, n. 16, p. 1546-1554, Apr 2003a.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, 348, n. 16, p. 1546-1554, Apr 2003b.

MESTRINER, F. L.; SPILLER, F.; LAURE, H. J.; SOUTO, F. O. *et al.* Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 49, p. 19595-19600, Dec 2007.

MILLS, J. G.; KOCH, K. M.; WEBSTER, C.; SIRGO, M. A. *et al.* The safety of ranitidine in over a decade of use. **Aliment Pharmacol Ther**, 11, n. 1, p. 129-137, Feb 1997.

MOESGAARD, F.; JENSEN, L. S.; CHRISTIANSEN, P. M.; THORLACIUS-USSING, O. *et al.* The effect of ranitidine on postoperative infectious complications following emergency colorectal surgery: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. **Inflamm Res**, 47, n. 1, p. 12-17, Jan 1998.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, 11, n. 11, p. 723-737, Oct 2011.

NIELSEN, H. J. Histamine-2 receptor antagonists as immunomodulators: new therapeutic views? **Ann Med**, 28, n. 2, p. 107-113, Apr 1996.

NIELSEN, H. J.; NIELSEN, H.; JENSEN, S.; MOESGAARD, F. Ranitidine improves postoperative monocyte and neutrophil function. **Arch Surg**, 129, n. 3, p. 309-315, Mar 1994.

OTTO, G. P.; SOSSDORF, M.; CLAUS, R. A.; RÖDEL, J. *et al.* The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. **Crit Care**, 15, n. 4, p. R183, Jul 2011.

PRESCOTT, H. C.; OSTERHOLZER, J. J.; LANGA, K. M.; ANGUS, D. C. *et al.* Late mortality

after sepsis: propensity matched cohort study. **BMJ**, 353, p. i2375, May 2016.

REINHART, K.; MENGES, T.; GARDLUND, B.; HARM ZWAVELING, J. *et al.* Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. **Crit Care Med**, 29, n. 4, p. 765-769, Apr 2001.

REMICK, D. G.; BOLGOS, G.; COPELAND, S.; SIDDIQUI, J. Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. **Infect Immun**, 73, n. 5, p. 2751-2757, May 2005.

RHODES, A.; EVANS, L. E.; ALHAZZANI, W.; LEVY, M. M. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Med**, 43, n. 3, p. 304-377, Mar 2017.

RICARTE-BRATTI, J. P.; BRIZUELA, N. Y.; JAIME-ALBARRAN, N.; MONTRULL, H. L. IL-6, MMP 3 and prognosis in previously healthy sepsis patients. **Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba**, 74, n. 2, p. 99-106, 2017.

RIOS-SANTOS, F.; ALVES-FILHO, J. C.; SOUTO, F. O.; SPILLER, F. *et al.* Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med**, 175, n. 5, p. 490-497, Mar 2007.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nat Rev Immunol**, 8, n. 10, p. 776-787, Oct 2008.

ROUFAIL, W.; BELSITO, A.; ROBINSON, M.; BARISH, C. *et al.* Ranitidine for erosive oesophagitis: a double-blind, placebo-controlled study. Glaxo Erosive Esophagitis Study Group. **Aliment Pharmacol Ther**, 6, n. 5, p. 597-607, Oct 1992.

RUDD, K. E.; JOHNSON, S. C.; AGESA, K. M.; SHACKELFORD, K. A. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**, 395, n. 10219, p. 200-211, 01 2020.

RYAN, M. E.; BARKER, C.; HAWCUTT, D. B. Ranitidine in short supply: why now, and where next? **Arch Dis Child**, 105, n. 4, p. 382-383, 04 2020.

SAGY, M.; AL-QAQAA, Y.; KIM, P. Definitions and pathophysiology of sepsis. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, 43, n. 10, p. 260-263, 2013 Nov-Dec 2013.

SAKPAL, T. V. Sample size estimation in clinical trial. **Perspect Clin Res**, 1, n. 2, p. 67-69, Apr 2010.

SALES JÚNIOR, J. A.; DAVID, C. M.; HATUM, R.; SOUZA, P. C. *et al.* [An epidemiological study of sepsis in Intensive Care Units: Sepsis Brazil study]. **Rev Bras Ter Intensiva**,

18, n. 1, p. 9-17, Mar 2006.

SALOMÃO, R.; FERREIRA, B. L.; SALOMÃO, M. C.; SANTOS, S. S. *et al.* Sepsis: evolving concepts and challenges. **Braz J Med Biol Res**, 52, n. 4, p. e8595, 2019.

SCHUETZ, P.; CASTRO, P.; SHAPIRO, N. I. Diabetes and sepsis: preclinical findings and clinical relevance. **Diabetes Care**, 34, n. 3, p. 771-778, Mar 2011.

SHEN, X. F.; CAO, K.; JIANG, J. P.; GUAN, W. X. *et al.* Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. **J Cell Mol Med**, 21, n. 9, p. 1687-1697, 09 2017.

SILVA, S. C.; BAGGIO-ZAPPIA, G. L.; BRUNIALTI, M. K.; ASSUNÇÃO, M. S. *et al.* Evaluation of Toll-like, chemokine, and integrin receptors on monocytes and neutrophils from peripheral blood of septic patients and their correlation with clinical outcomes. **Braz J Med Biol Res**, 47, n. 5, p. 384-393, May 2014.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; SHANKAR-HARI, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, 315, n. 8, p. 801-810, Feb 2016.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CALIXTO-LIMA, L.; VITORINO, R. R. *et al.* Sepsis: an update. **Rev Bras Ter Intensiva**, 23, n. 2, p. 207-216, Jun 2011.

SOGAYAR, A. M.; MACHADO, F. R.; REA-NETO, A.; DORNAS, A. *et al.* A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, 26, n. 5, p. 425-434, 2008.

SONG, J.; PARK, D. W.; MOON, S.; CHO, H. J. *et al.* Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. **BMC Infect Dis**, 19, n. 1, p. 968, Nov 2019.

SOUTO, F. O.; ALVES-FILHO, J. C.; TURATO, W. M.; AUXILIADORA-MARTINS, M. *et al.* Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, 183, n. 2, p. 234-242, Jan 2011.

SPILLER, F.; CARLOS, D.; SOUTO, F. O.; DE FREITAS, A. *et al.* α 1-Acid glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice. **Diabetes**, 61, n. 6, p. 1584-1591, Jun 2012.

SPILLER, F.; COSTA, C.; SOUTO, F. O.; VINCHI, F. *et al.* Inhibition of neutrophil migration by hemopexin leads to increased mortality due to sepsis in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, 183, n. 7, p. 922-931, Apr 2011.

STOUDT, K.; CHAWLA, S. Don't Sugar Coat It: Glycemic Control in the Intensive Care Unit. **J Intensive Care Med**, 34, n. 11-12, p. 889-896, 2019 Nov-Dec 2019.

TAVARES-MURTA, B. M.; MACHADO, J. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation**, 25, n. 4, p. 247-253, Aug 2001.

TAVARES-MURTA, B. M.; ZAPAROLI, M.; FERREIRA, R. B.; SILVA-VERGARA, M. L. *et al.* Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. **Crit Care Med**, 30, n. 5, p. 1056-1061, May 2002.

TIKHONOV, I.; DOROSHENKO, T.; CHALY, Y.; SMOLNIKOVA, V. *et al.* Down-regulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils upon activation of whole blood by *S. aureus* is mediated by TNF- α . **Clin Exp Immunol**, 125, n. 3, p. 414-422, Sep 2001.

UHLE, F.; LICHTENSTERN, C.; BRENNER, T.; WEIGAND, M. A. [Pathophysiology of sepsis]. **Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther**, 50, n. 2, p. 114-122, Feb 2015.

WHITE, C. M. Understanding and Preventing (**Ann Pharmacother**, 54, n. 6, p. 611-614, 06 2020.

XIAO, H.; SIDDIQUI, J.; REMICK, D. G. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. **Infect Immun**, 74, n. 9, p. 5227-5235, 2006.

YANG, S.; QI, H.; KAN, K.; CHEN, J. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Promote Hypercoagulability in Patients With Sepsis. **Shock**, 47, n. 2, p. 132-139, 02 2017.

YAO, R. Q.; REN, C.; WU, G. S.; ZHU, Y. B. *et al.* Is intensive glucose control bad for critically ill patients? A systematic review and meta-analysis. **Int J Biol Sci**, 16, n. 9, p. 1658-1675, 2020.

ZHAO, G. J.; LI, D.; ZHAO, Q.; SONG, J. X. *et al.* Incidence, risk factors and impact on outcomes of secondary infection in patients with septic shock: an 8-year retrospective study. **Sci Rep**, 6, p. 38361, 12 2016.

APÊNDICE A - Soluções utilizadas no laboratório

Solução de Tampão Salina-fosfato (PBS) 10X (Solução Mãe):

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck)	80 g
Cloreto de Potássio (KCl, Merck)	2 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ , Merck)	11,5 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH ₂ PO ₄ , Merck)	20 g
Água deionizada Milli-Q q.s.p.	1000 ml

A solução foi estocada à 4 °C.

PBS 1X:

PBS10X	100 ml
Água Milli-Q q.s.p.	900 ml

O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4 °C.

Tampão de citometria de fluxo (Tampão de FACS):

Soro Bovino Fetal inativado (SBF-I, Difco) 2%	2 ml
PBS 1X q.s.p.	100 ml

A solução foi preparada no dia do uso e utilizada gelada.

Tampão de lise:

Cloreto de amônio (NH ₄ Cl, Merck)	4,01 g
EDTA (Labsynth)	0,18 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ , Vetec)	0,42 g
Água de Milli-Q q.s.p.	500 ml

O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4 °C.

Tampões utilizados para o ensaio de ELISA:

(A) Solução de ligação (coating buffer) pH 8.4

Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ , Merk)	4,2 g
Água de Milli-Q q.s.p.	500 ml

(B) Tampão de bloqueio (para ELISA da companhia eBioscience e RD)

Albumina derivada de soro bovino (BSA, Sigma) 0,1 %	0,1 g
PBS 1X q.s.p.	100 ml

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Protocolo de pesquisa: **Estudo clínico fase II, randomizado, duplo-cego, sobre o uso da ranitidina em pacientes diabéticos com sepse grave e choque séptico**

O _____ senhor(a) _____ ou _____ responsável _____ legal _____ está sendo convidado para participar da pesquisa “Estudo Clínico fase II, randomizado, duplo-cego, sobre o uso da ranitidina em paciente diabéticos com sepse grave e choque séptico”. A participação nesse estudo é totalmente voluntária. Você (paciente) e/ou seu representante legal não tem que obrigatoriamente fazer parte dele. Se aceitar participar, o consentimento poderá ser retirado pelo senhor(a) ou pelo(a) paciente em qualquer momento por qualquer motivo, sem que esta decisão cause qualquer prejuízo no tratamento.

Por que este estudo está sendo feito?

A sepse é uma infecção que está envolvendo todo o seu corpo. Estas infecções podem ser graves e os médicos têm muita dificuldade em encontrar o tratamento certo porque cada pessoa pode ter uma resposta diferente ao tratamento dependendo da idade e de outras doenças que possa ter, como o diabetes mellitus. Como você ou o seu familiar (o paciente) tem diabetes, essa infecção pode ser mais grave ainda e, até o momento, não existe nenhum tratamento específico para pacientes diabéticos com sepse. Alguns estudos experimentais demonstraram que a ranitidina pode beneficiar quadros de sepse em animais diabéticos, entretanto, os resultados ainda não foram confirmados em seres humanos. A ranitidina é um medicamento muito utilizado na prática médica para o tratamento de diversas doenças, como úlcera péptica, esofagite, refluxo gastroesofágico, profilaxia de úlcera de stress, entre outras.

Qual é o objetivo desse estudo?

O objetivo desse estudo é avaliar o efeito da ranitidina no tratamento de pacientes diabéticos com sepse. A ranitidina é uma medicação frequentemente utilizada na prática médica para o tratamento de diversas doenças, como úlcera péptica, esofagite, refluxo gastroesofágico, profilaxia de úlcera de stress, entre outras.

Quais são os procedimentos realizados no estudo?

A participação na pesquisa é voluntária. Se consentir em participar ou que o(a) seu(sua) familiar (paciente) participe desse estudo, ele(a) será sorteado para receber a

ranitidina ou placebo (soro fisiológico). Acredita-se que a ranitidina terá benefícios adicionais, porém, como isso ainda não foi comprovado, o mais ético é escolher o tratamento por meio desse sorteio. Caso o paciente seja sorteado para receber a ranitidina, ele(a) receberá a ranitidina, por via endovenosa (na veia), na dose de 50mg ou 300mg, 4 vezes por dia, por 7 dias. Caso o(a) paciente seja sorteado para não receber a ranitidina, ele(a) receberá 100ml de soro fisiológico, por via endovenosa (na veia), 4 vezes por dia, por 7 dias. Na dose que será utilizada, o soro não oferece risco de reação ao paciente.

Independente se o(a) paciente receber ranitidina ou placebo, o tratamento padrão de sepse será realizado da mesma forma.

Para avaliar o efeito deste estudo, coletaremos amostras de sangue (15 mL de sangue, o que equivale a aproximadamente 1 colher de sopa) nas primeiras 24 horas da admissão, 72 horas depois da admissão e no sétimo dia de internação. Essa coleta será feita por profissional da enfermagem qualificado em veia periférica (como no braço ou nas mãos) usando uma agulha fina. A coleta será semelhante à coleta de exames de sangue feitos na rotina. O procedimento pode gerar dor local, hematoma (pequeno extravasamento de sangue) ou inchaço. Caso isso ocorra, serão tomados os cuidados locais para tratamento (como compressão e limpeza) e o sangue será coletado em outra veia.

Após 28 dias e após 6 meses, a equipe do estudo entrará em contato com o(a) paciente por telefone para saber como está saúde dele.

Quais são os possíveis benefícios do estudo?

Acredita-se que o uso da ranitidina possa melhorar a inflamação e diminuir a mortalidade dos pacientes com sepse. Considerando que metade dos pacientes com sepse ainda falece, mesmo com todo o tratamento disponível hoje, o benefício em potencial é grande. Além disso, caso seja comprovado o benefício da ranitidina, você ou ele(a) estará contribuindo para que, após o resultado do estudo, muitos pacientes deixem de falecer em todo o mundo

Quais são os possíveis riscos do estudo?

Apesar de ser utilizada com frequência, a ranitidina não é isenta de riscos. Existe um risco muito pequeno (menor do que 1%) de dor de cabeça, náusea, vômitos e dor abdominal.

Além disso, a coleta de sangue pode gerar dor local, hematoma (pequeno extravasamento de sangue) ou inchaço. Para minimizar essas complicações os pacientes serão estritamente monitorados durante todo o uso da ranitidina e esta será interrompida imediatamente ao primeiro sinal de efeito colateral.

Existe algum custo e reembolso?

Não. A participação no estudo não envolve nenhum custo para o(a) senhor(a), o(a) paciente ou convênio de saúde. Dessa forma não há reembolso ou qualquer tipo de recompensa financeira.

E se eu não quiser participar do estudo, há outra opção?

O(A) senhor(a) pode livremente escolher se consente ou não a participação sua ou do(a) paciente no estudo. Se não quiser, todos os cuidados durante toda a internação serão oferecidos conforme rotina da instituição.

As minhas informações e os resultados dos meus exames serão confidenciais?

Os dados só serão usados para os propósitos do estudo e serão mantidos em confidencialidade. Os resultados do estudo serão divulgados, para fins acadêmicos e científicos, sem a identificação de nenhum paciente participante. Portanto, você não será identificado e será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a sua privacidade.

Eu posso desistir de participar do estudo?

Se você decidir pela participação voluntária sua ou do(a) paciente no estudo, o senhor(a) poderá retirar o consentimento em qualquer momento, sem que isso traga prejuízos para o senhor(a) ou ele(a). Ressaltamos que todos os cuidados nesta instituição continuarão sendo oferecidos. Da mesma maneira, quando o(a) paciente estiver em condições de se comunicar, ele(a) poderá também retirar seu consentimento caso não concorde com sua participação na pesquisa.

Eu posso saber do que esta sendo feito comigo?

Os pesquisadores garantem o compromisso de que será prestada informação atualizada durante o estudo ao paciente ou responsável legal, mesmo que essa possa afetar a vontade do paciente ou responsável legal de continuar dele participando.

Eu continuarei recebendo seguimento?

Os pesquisadores garantem o compromisso de que você será devidamente acompanhado durante todo o período de sua participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

O(A) senhor(a) tem todo tempo necessário para ler este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e decidir se quer que seu familiar (paciente) participe deste estudo. Sinta-se à vontade para discutir com outros familiares, amigos ou equipe de saúde assistente.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Se você tiver qualquer dúvida em relação aos direitos dos participantes de pesquisa clínica ou em relação aos aspectos éticos envolvidos, fique à vontade para entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no telefone 3602-2228.

A equipe do estudo está à disposição para prestar quaisquer esclarecimentos antes, durante e após o estudo nos seguintes telefones:

Dr. Marcos de Carvalho Borges (Investigador Principal): 3602-1225

Dr. Daniel Zoppi (Sub-Investigador): 3602-1225

Li e compreendi os objetivos do estudo, todos os procedimentos que serão realizados, estou ciente dos possíveis riscos e benefícios e, em caso de qualquer dúvida, poderei entrar em contato com a equipe do estudo. Receberei uma cópia deste documento.

Nome do Participante

Nome do Representante Legal

_____/_____/_____
Data e Assinatura do Representante Legal ou do paciente

Nome do Pesquisador

_____/_____/_____
Data e Assinatura do Pesquisador