RODRIGO VAZ FERREIRA

**Efeito da pentoxifilina sobre a coagulopatia em
modelo suíno de múltiplos traumas**

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

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Profa. Dra. Edna Frasson de
Souza Montero

**(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)**

**São Paulo
2018**

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.

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Rodrigo Vaz
Efeito da pentoxifilina sobre a coagulopatia em
modelo suíno de múltiplos traumas / Rodrigo Vaz
Ferreira. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.
Orientador: Edna Frasson de Souza Montero.

Descritores: 1.Pentoxifilina 2.Choque
hemorrágico 3.Trauma 4.Transtornos da coagulação
5.Modelos animais 6.Tromboelastografia

USP/FM/DBD-335/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedicatória

Aos meus pais, **Itamar** e **Maria José**, por seu sacrifício e suporte, pelo seu exemplo incomparável, amor desde o primeiro dia, cuidado constante, pelos terços e orações diárias. Por me levarem à igreja como quem leva uma criança a uma loja de brinquedos, me deram o equivalente a mil vidas.

À **Monique**, que encerra em si todos os predicados. Que me empresta seu olhar e as cores que vê, todos os dias. E me permitiu ser seu marido, sua família. Meu presente de Deus. A música que tocava quando entrava na nave, encerra meu destino. Sou um homem de sorte.

Ao meu irmão **Rafael**, que tem um coração imenso. Monumental. Sua família é como minha e me sinto honrado por ser seu irmão. O nó na garganta de estar longe só não é maior do que o poder de estar um minuto ao seu lado. Com dois, o nó perde de goleada.

Agradecimento Especial

À **Monique**, minha esposa. Você foi ouvinte, leitora, dirigiu ensaios da apresentação, deu suporte de todas as formas. E isto não estava no contrato de casamento. Isso é a benção de ser casado com alguém tão forte, altruísta e inteligente. Esse trabalho sem você seria impossível.

À **Profa. Dra. Edna Frasson de Souza Montero**, Professora Associada da FMUSP e orientadora desta tese. Meus pais ao rezar devem ter pedido pela melhor orientadora que Deus pudesse me reservar. Paciente, amiga, focada, disciplinada, conselheira e exemplo a ser seguido na minha carreira. Espero não a decepcionar ao longo do caminho.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Edivaldo Massazo Utiyama**, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Geral e Trauma da FMUSP, apoiador indispensável desse projeto. Em anos austeros para a pesquisa no Brasil, sua ajuda foi essencial para a realização desse trabalho. Nas salas de cirurgia, enfermarias, ao avaliar um projeto, um caso ou ao aconselhar, se mostrou exemplo para muitas gerações de cirurgiões, ansiosos por parecer um pouco com ele. Eu sou mais um fã incondicional.

Ao **Prof. Dr. Samir Rasslan**, ex-Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Geral e Trauma da FMUSP, responsável pelos anos em eu fui residente da escola mais notável de Cirurgia Geral e Trauma do país. Ao estimular-me a seguir a carreira docente, introduzindo-me na pós-graduação e na pesquisa, aconselhando-me a nunca abandonar a academia, apresentou-me o que hoje interpreto ser um dos principais motivos da minha realização como homem.

À **Dra. Denise Aya Otsuki**, Pesquisadora Científica no Laboratório de Anestesiologia LIM 08 da FMUSP. Os dias longos se tornaram curtos ao lado de tão brilhante, capaz e trabalhadora mulher. Aprendi muito em seu laboratório e me sinto infinitamente grato pelos cuidados com os animais, pelo ensino de habilidades que não tinha, pelo suor dedicado e trabalho, e pelo respeito com que fui recebido em meus imaturos e iniciais passos na pesquisa.

Aos membros do Laboratório de Investigação Médica 08 (LIM-08), **Dra. Débora Rothstein Ramos Maia** e **Gilberto de Mello Nascimento**, por tanto trabalho, tanta dedicação, cuidando do que achava ser meu, e que se tornou nosso. Vocês são exemplo do que se entende por trabalho em equipe, e a sinergia desse time é ímpar.

Aos membros do Laboratório de Investigação Médica 62 (LIM-62), **Mario Matsuo Itinoshe, Marco de Luna, Luci Takasaka, Ana Maria Heimbecker e Elisabete Minami**, sempre à disposição, entusiasmados, mantendo viva a chama da pesquisa básica, tão pouco valorizada e, no entanto, essencial à academia.

Aos amigos da Divisão de Clínica Cirúrgica III dos Hospital das Clínicas da FMUSP e do Programa de Residência de Cirurgia Geral e Geral Avançado, todos que me apoiaram e me ensinaram tanto ao longo dos anos nessa Casa, e que ainda tenho como mestres e amigos. Sinto me muito orgulhoso pela chance de conviver com vocês. E espero longos anos à frente.

Aos amigos e colegas de trabalho na Universidade do Estado do Amazonas, em especial ao Reitor, **Prof. Dr. Cleinaldo de Almeida Costa**, pela compreensão, apoio e estímulo nessa longa jornada de grandes distâncias, mais fácil estando ao lado de vocês.

Aos meus alunos na Universidade do Estado do Amazonas, fonte de uma surpresa imensa, a alegria de ser professor. Ainda que não saibam, sua compreensão com minha jornada e o estímulo de um olhar de admiração não merecida, foi e é combustível ético, científico e de carinho.

Aos amigos e colegas de trabalho em Manaus, que contribuíram com sua parceria, ânimo e disponibilidade, na cobertura das tarefas e no convívio diário durante a construção dessa tese. Que os anos vindouros tragam um trabalho mais valorizado e mais respeitado. A valorização da profissão médica não gera perdedores.

Aos meus amigos manauaras, que ao me receber em sua cidade como se fosse um original, tornaram minha vida mais feliz. Aos 39 anos de idade, trazem me à juventude, e isso é bom. Rejuvenesço a cada momento e meus dias aqui são como os dias em Resende.

Aos meus amigos de faculdade, aos seus pais, que me receberam em suas casas e me trataram como filho. Ainda ouço os seus conselhos, ainda sinto sua falta, ainda espero comemorar a vida muitas vezes com vocês. O estudo em conjunto, a vida partilhada, os intensos anos de convivência não se apagam. O purê de abóbora, a música número 08, o violão, sempre restarão como memória desse tempo.

Aos meus familiares, em especial minha **Tia Dita** e minha **Tia Rosa**, que ao me apoiar, me receberam em sua casa, me empurraram sempre pra cima. Suas orações, seu carinho, aquecem o coração mesmo tantos quilômetros distantes.

Aos **meus avós** (*in memoriam*), ainda sinto o cheiro de seu afago, o gosto de sua comida, o som de suas vozes. Por tê-los visto, enxerguei meus pais como crianças um dia. E esse ciclo me ensinou sobre a vida mais do que imaginava aprender.

Aos meus sogros, **Rossires** e **Henrique**, pelo apoio diário, pelo cuidado maternal e paternal que me dedicam, diariamente. Poder cuidar da sua filha e com ela ser uma família é um presente sem proporção. A tapioca, o tucumã, a ajuda ao construir nossa vida aqui, o convívio com o Joseph, vem de bônus. Nossa!

Aos amigos e irmãos, **Dr. Sérgio Quilici Belczak** e **Dra. Emanuele Villela Belczak**. Profissionais exemplares, estudiosos, conselheiros, uma família linda. Receberam-me sempre em sua casa, e o que já era amizade virou um laço familiar. Quero junto com minha família envelhecer ao lado da sua. Uma gratidão eterna está posta entre nós.

Ao meu irmão **Rafael**, com sua esposa **Alane** e meus sobrinhos, **Alice**, **Gabriela** e **Lucas**. Sentir o carinho de vocês, o seu apoio e sua torcida, é mais do que sonhava. Ser um irmão, cunhado e tio exemplar é um propósito. Porque estou ficando pra trás no tamanho das suas realizações.

Aos meus pais, **Itamar e Maria José**. As horas de trabalho, sem dormir, a preocupação. O suporte financeiro e a educação que me proporcionaram não podem ser pagos ou devolvidos. Some-se a isso a origem simples de nossa família e o feito ganha volume. Mas nada se compara ao amor que recebo diariamente. E ao exemplo de como uma família deve ser.

À minha amiga e parceira de projeto, **Dra. Juliana Mynssen da Fonseca Cardoso**. Sua energia no projeto, sua parceria, suas ideias. Esse projeto não andaria sem sua participação. A igualdade de gêneros e o papel da mulher já foram redefinidos há tempos. E alguns já vivem essa realidade sem bravata. Juliana é assim.

Epígrafe

七転び八起き

(Caia sete vezes, levante oito) – tradução livre

NORMATIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
LISTAS DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	XVI
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Reanimação volêmica, soluções e farmacoterapia adjuvante.....	6
2 OBJETIVO	10
3 MÉTODOS	13
3.1 Amostra	13
3.2 Procedimento anestésico e instrumentalização do animal	14
3.3 Procedimento experimental	16
3.4 Variáveis fisiológicas	19
3.5 Análises laboratoriais.....	19
3.6 Análise estatística	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Mortalidade	27
4.2 Parâmetros gerais	27
4.3 Parâmetros hemodinâmicos	31
4.4 Hemograma	35
4.5. Gasometria	39
4.6. Parâmetros de coagulação.....	47
4.7 Tromboelastometria	53
4.8 Fibrinogênio	65
5 DISCUSSÃO	67
5.1 Modelo experimental	68
5.2 Uso de cristaloides versus hemocomponentes	71
5.3 A avaliação da coagulopatia.....	73
5.4 Fibrinogênio	74

5.5 Considerações finais.....	76
6 CONCLUSÕES	77
7 ANEXOS	79
8 REFERÊNCIAS	81

Listas

ABREVIATURAS E SIGLAS

ATLS	<i>Advanced Trauma Life Support</i>
AAST	Associação Americana de Cirurgia de Trauma
ABE	Excesso de Bases
ALFA	Ângulo alfa
aPC	Proteína C ativada
BPM	Batimentos por minuto
CFT	<i>Clotting formation time</i>
CH	Concentrados de hemácias
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CTA	Coagulopatia traumática aguda
DALY	<i>Disability-adjusted life year</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DCR	<i>Damage control resuscitation</i>
EPCR	Receptor de Proteína C endotelial
FC	Frequência cardíaca
HB	Hemoglobina
HCO ₃	Bicarbonato
HT	Hematócrito
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ISS	<i>Injury Severity Score</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MAXV	<i>Maximum velocity</i>
MCF	<i>Maximum clot firmness</i>
MCFT	<i>Maximum clot firmness time</i>
ML	<i>Maximum lysis</i>
PAI-1	Inibidor de plasminogênio ativado tipo 1

PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PFC	Plasma fresco congelado
PMN	Polimorfonucleares
PTX	Pentoxifilina
SIDA	Síndrome da imunodeficiência humana adquirida
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TCE	Trauma cranioencefálico
TM	Trombomodulina.
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TP	Tempo de Protrombina
t-PA	Ativador de plasminogênio tecidual
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

FIGURAS

Figura 1 -	Fotografia do animal após instrumentalização.	15
Figura 2 -	Fotografia do lobo médio direito com lesão	18
Figura 3 -	Delineamento do estudo	21
Figura 4 -	Ilustração do mecanismo de funcionamento da tromboelastometria (ROTEM®)	23
Figura 5 -	Valores em graus Celsius (°C) da temperatura por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	30
Figura 6 -	Curvas de FC durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	32
Figura 7 -	Curvas da pressão arterial média (PAM) durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	34
Figura 8 -	Valores de Hb em g/dL por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação:	36
Figura 9 -	Valores de hematócrito (%) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação:	38
Figura 10 -	Valores do pH, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	40
Figura 11 -	Valores do BE por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	42
Figura 12 -	Valores do HCO ₃ , em mmol/L, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	44

Figura 13 -	Valores do lactato, em mmol/L, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	46
Figura 14 -	Valores de INR, expresso pela sua média, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	48
Figura 15 -	Valores de TP, em segundos, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	50
Figura 16 -	Valores do TTPA (expresso em segundos) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	52
Figura 17 -	Valores do CT (expresso em segundos) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	54
Figura 18 -	Valores do CFT (expresso em segundos) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	56
Figura 19 -	Valores do MCF (expresso em milímetros) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	58
Figura 20 -	Valores do ângulo alfa (expresso em graus) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	60
Figura 21 -	Valores do ângulo A10 (expresso em milímetros) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	62
Figura 22 -	Valores da ML (expresso em %) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	64
Figura 23 -	Valores do Fibrinogênio (expresso em mg/dl) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação	66

TABELAS

Tabela 1 -	Volume do sangramento estimado (peso total das compressas após sangramento - peso seco das compressas), em mL/kg, e desvio-padrão da amostra....	28
Tabela 2 -	Valores da temperatura (expressos em graus Celsius, média) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.....	30
Tabela 3 -	Valores da FC (expressos em BPM - média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos	32
Tabela 4 -	Valores da PAM (expressos em mmHg - mediana) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos	34
Tabela 5 -	Valores da hemoglobina (expressos em mg/dL, média) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	36
Tabela 6 -	Valores do hematócrito (expressos em %, média) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	38
Tabela 7 -	Valores do pH (média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos	40
Tabela 8 -	Valores do ABE (expressos em mmol/L, média $\pm$ desvio-padrão), nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos	42
Tabela 9-	Valores do HCO ₃ , em mmol/L, nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos	44
Tabela 10 -	Valores do lactato, (expressos em mmol/L, média $\pm$ desvio-padrão), nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos	46

Tabela 11 - Valores do INR (expressos em razão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	48
Tabela 12 - Valores do TP (em segundos) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	50
Tabela 13 - Valores do TTPA (expressos em segundos, média) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	52
Tabela 14 - Valores do CT (expressos em segundos, média) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	54
Tabela 15 - Valores do CFT (expressos em segundos, mediana) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	56
Tabela 16 - Valores do MCF (expressos em milímetros, mediana) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	58
Tabela 17 - Valores do ângulo alfa (expressos em graus, mediana) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	60
Tabela 18 - Valores do A10 (expressos em milímetros, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	62
Tabela 19 - Valores da ML (expressos em %, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	64
Tabela 20 - Valores do Fibrinogênio (expressos em mg/dl, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.	66

Resumo

Ferreira RV. *Efeito da pentoxifilina sobre a coagulopatía em modelo suíno de múltiplos traumas* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Aproximadamente 5,8 milhões de pessoas morrem anualmente vítimas de trauma no mundo. A reposição volêmica inicial dos pacientes graves politraumatizados com choque hemorrágico tem características distintas hoje quando comparada à proposta não mais do que uma década atrás. A infusão reduzida de fluidos associada à transfusão precoce de hemoderivados é o padrão adotado em portadores de hemorragia maciça, no que se chama na literatura de *damage control resuscitation* (DCR). Entretanto, a administração precoce de componentes do sangue, implica em limitações de armazenamento, transporte, disponibilidade, compatibilidade, reações transfusionais e custo. Assim, estratégias medicamentosas que possam beneficiar o paciente politraumatizado no tratamento do sangramento devem ser desenvolvidas. As pesquisas atuais buscam medidas que possam agir na resposta inflamatória e na coagulopatía envolvidas nas lesões traumáticas e no choque hemorrágico. Desta forma, decidiu-se avaliar o potencial da administração precoce de Pentoxifilina (PTX) em associação com Ringer lactato (RL) e seus efeitos na coagulopatía associada ao trauma. Foi utilizado modelo experimental suíno de choque hemorrágico e politrauma. Foram utilizados 23 suínos, machos, da raça Landrace, com peso médio de 28,5 kg randomizados em 3 grupos: Controle (n=5), RL (n=5) e PTX (n=7). Os animais foram submetidos à anestesia geral, exceto o grupo controle, a uma fratura de fêmur, seguido de choque hemorrágico controlado e, por fim, uma lesão hepática como hemorragia não controlada. Foram analisados parâmetros hemodinâmicos, laboratoriais e gasometria, testes de coagulação padrão e tromboelastometria. Os animais submetidos ao experimento apresentaram taquicardia, hipotensão arterial, hipotermia, acidose, redução de hemoglobina e alteração nos testes de coagulação e viscoelásticos. O lactado no tempo Final mostrou-se mais elevado no grupo PTX, quando comparado ao grupo RL ($p=0,01$). Os dados da tromboelastometria não mostraram diferença entre os grupos submetidos ao experimento. No tempo Final, observou-se uma redução do fibrinogênio menor no grupo tratado com PTX, quando comparado ao grupo RL ($p<0,01$). A análise dos efeitos da pentoxifilina associada à reanimação volêmica sugere melhora dos níveis de fibrinogênio após sua administração seguindo a hemorragia e trauma.

Descritores: pentoxifilina; choque hemorrágico; trauma; transtornos da coagulação; modelos animais; tromboelastografia.

Abstract

Ferreira RV. *Effect of pentoxifylline on coagulopathy in a multiple trauma swine model* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Approximately 5.8 million people die each year victim of trauma worldwide. The initial volume replacement of severely injured patients with hemorrhagic shock has different characteristics today than a decade before. Low-volume fluid resuscitation associated with early transfusion of blood products is the standard adopted in patients with massive hemorrhage, so called damage control resuscitation (DCR). However, early administration of blood components implies limitations in storage, transport, availability, compatibility, transfusion reactions, and cost. Thus, drug strategies that may benefit the severely injured patient in the treatment of bleeding should be developed. Current research seeks measures that can modulate the inflammatory response and coagulopathy involved in traumatic injuries and hemorrhagic shock. Therefore, we decided to evaluate the role of early administration of Pentoxifylline (PTX) in association with RL and its effects on coagulopathy and traumatic inflammatory response. A porcine model of multiple trauma and hemorrhagic shock was used. Twenty-three Landrace male pigs were used, with a mean weight of 28.5 kg randomized into three groups: Control (n=5), RL (n=5), and PTX (n=7). The animals were submitted to general anesthesia (except the control group), femur fracture, followed by controlled hemorrhagic shock, and, finally, a hepatic injury (as uncontrolled hemorrhage simulation). Hemodynamic parameters, laboratory tests, standard coagulation tests and thromboelastometry were analyzed. The animals submitted to the experiment presented tachycardia, hypotension, hypothermia, acidosis, hemoglobin decrease and impaired coagulation and viscoelastic tests. Lactate levels at the end of the experiment were higher in the PTX group when compared to RL ($p=0,01$). Data extracted from thromboelastometric tests have shown no difference between the groups submitted to the protocol. Fibrinogen reduction (consumption) were significantly lower in the PTX group when compared to RL ($p<0,01$). The analysis of pentoxifylline effects suggests less fibrinogen consumption after PTX administration.

Descriptors: pentoxifylline; shock, hemorrhagic; trauma; blood coagulation disorders; animal models; thromboelastometry.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 5,8 milhões de pessoas morrem anualmente vítimas de trauma no mundo. Esse número é maior do que o número de mortes provocadas por malária, tuberculose e síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA) somadas no mesmo período e corresponde a 10% do número total de mortes em um ano ⁽¹⁾. Adicionalmente, 90% dessas mortes ocorrem em países de baixa e média renda, como o Brasil, e é a principal causa de morte no mundo em indivíduos de até 45 anos. No Brasil, em 2011, segundo dados extraídos do DATASUS, 96.063 óbitos ocorreram quando somados homicídios e acidentes de transporte terrestre ⁽²⁾. O impacto da doença pode ser ainda mais alarmante quando se analisa o número de indivíduos com sequelas provocadas pelo trauma ou pelos DALYs (uma estimativa de anos de vida saudável perdidos por doença ou deficiência) ⁽³⁾.

Nas fases iniciais do trauma, o choque hemorrágico é uma das principais causas de morte, ficando atrás apenas do trauma cranioencefálico (TCE). A hemorragia é a causa mais comum de mortes potencialmente evitáveis ⁽⁴⁾. A perda sanguínea se dá através da lesão *per se* e se complica pela tríade letal do trauma, que associa a acidose à hipotermia e à coagulopatia ^(5, 6). Em descrições prévias, essa coagulopatia era secundária à hemodiluição, ao consumo de fatores de coagulação e ao consumo de plaquetas. Associada à hemodiluição, a administração de fluidos não

aquecidos e a perda de calor ambiental geravam o ambiente necessário ao ciclo vicioso dessa tríade letal ^(7, 8).

A reposição volêmica inicial dos pacientes graves politraumatizados com choque hemorrágico tem características distintas hoje quando comparada à proposta não mais do que uma década atrás ⁽⁹⁾. A infusão reduzida de fluidos associada à transfusão precoce de hemoderivados é o padrão adotado em portadores de hemorragia maciça, no que se chama na literatura de *damage control resuscitation* (DCR). O termo deriva da “cirurgia do controle de danos” proposta por Rotondo em 1993 ⁽¹⁰⁾. Essa infusão reduzida de fluidos associada à transfusão precoce de hemoderivados é parte desse modelo concomitante à cirurgia de controle de danos, quando esta é necessária, de forma a diminuir as consequências da resposta imune e metabólica, visando restaurar precocemente a perfusão e a obtenção de estabilidade hemodinâmica ^(11, 12).

Muitos pacientes que sobrevivem à hemorragia maciça desenvolvem falência de múltiplos órgãos, frequentemente associada a sepse. Falência de múltiplos órgãos e sepse são resultado da resposta sistêmica que se segue ao trauma grave. Hoje pacientes que experimentam trauma grave podem sobreviver por avanços no controle e na correção da perda sanguínea ⁽¹³⁾. Consequentemente, respostas que eram protetoras em traumas de menor intensidade passam a ser exageradas e destrutivas nos traumas de gravidade elevada. A resposta sistêmica ao trauma grave envolve interações entre a hemostasia, inflamação e o sistema neuroendócrino, agravando o dano inicial causado pela hipoperfusão e reperfusão. O endotélio ativado pela exposição

a citocinas inflamatórias se torna mais poroso, permitindo que mediadores do dano tecidual ganhem acesso ao espaço intercelular.

A lesão tecidual e a hipoperfusão secundária ao choque hemorrágico desencadeiam uma resposta inflamatória sistêmica multifatorial conhecida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) ^(13, 14). A SIRS é resultado da liberação de fatores endógenos conhecidos como alarminas ou DAMPs (*damage-associated molecular patterns*). Elas são secretadas por células imunes ativadas (como os neutrófilos) ou liberadas pela morte celular ⁽¹³⁾. Em estudo de 1997, Gando e cols. ⁽¹⁵⁾ identificaram elevados níveis de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina 1 Beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 8 (IL-8) em pacientes politraumatizados, com lesão grave e coagulação intravascular disseminada (CIVD) admitidos em serviço de emergência ⁽¹⁶⁾. Tais marcadores inflamatórios são ativadores do sistema complemento, ativadores de leucócitos, ativam o endotélio e participam do sistema coagulo-fibrinolítico que se segue. Através da liberação de fosfolipase A2 induzida por essas citocinas há aumento da concentração do fator ativador de plaquetas.

A infiltração tecidual e ativação neutrofílica também aumentam, devido à indução da óxido nítrico sintase. Tanto a IL-1 quanto o TNF- α estimulam o endotélio e monócitos a expressarem fator tecidual que induz a formação de trombina. A IL-1-beta e o TNF- α atuam na via da Proteína C ativada (aPC) por meio da regulação do Receptor de Proteína C endotelial (EPCR), que é necessário para ligação do complexo proteína C- trombina-trombomodulina à superfície endotelial celular ⁽¹⁷⁾. Esse conjunto de reações provocam efeitos

na coagulação de forma pró-coagulante, inibindo a anticoagulação e a fibrinólise. Como exposto, os mediadores inflamatórios causam impacto na regulação da coagulação, como pró-coagulantes (com aumento de fator tecidual, fibrinogênio, receptores de membrana), inibindo anticoagulantes (com a diminuição de trombomodulina, EPCR, antitripsina) e inibindo a fibrinólise, com o aumento do inibidor de plasminogênio ativado tipo 1 (PAI-1) (14, 16, 17).

A coagulopatia é decorrente de múltiplos fatores no paciente politraumatizado, com componentes secundários como a hemodiluição, mas também com componentes primários como o choque e a lesão tecidual (18-20). Insultos como trauma, isquemia, infecção, hipóxia ou reperfusão desencadeiam respostas para manter a homeostase corpórea, que envolvem inflamação, descarga neuroendócrina, coagulação e fibrinólise. A resposta hemostática é um processo dinâmico dependente do balanço entre coagulação e fibrinólise, sendo a coagulopatia decorrente do desequilíbrio desse balanço (15, 21, 22).

Novos conceitos sobre a coagulopatia e o conceito da coagulopatia traumática aguda (CTA) surgiu com Brohi e cols., em 2003, ampliando o que se entendia sobre o evento e relatando que ainda antes da infusão de soluções na reanimação do paciente politraumatizado já existia coagulopatia (23). Sua análise dos testes de coagulação de 1.088 pacientes com trauma grave (mediana do *Injury Severity Score* – ISS – de 20), imediatamente após chegarem à emergência, revelou que 24,4% dos pacientes já apresentavam coagulopatia na admissão e antes da administração de fluidos. No estudo,

entendia-se por coagulopatia na admissão um Tempo de Protrombina (TP) > 18 segundos, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPa) > 60 segundos ou Tempo de Trombina (TT) > 15 segundos.

MacLeod e cols., após a análise de 7.638 registros de pacientes com trauma (mediana do ISS = 9), observaram que a prevalência de coagulopatia precoce ocorreu em 28% dos pacientes, que apresentavam o TP > 14 segundos e em 8% dos pacientes, que apresentavam o TTPa > 34 segundos⁽²⁴⁾. Dessa forma, concluíram que a coagulopatia seria um fator de risco independente para mortalidade⁽²⁵⁾. Tornou-se, a partir de então, necessário entender a CTA como um evento deflagrado primária e precocemente, decorrente da lesão tecidual, da hipoperfusão tecidual, da resposta inflamatória e do choque hemorrágico associado⁽²⁶⁻²⁸⁾.

1.1 Reanimação volêmica, soluções e farmacoterapia adjuvante

O uso de cristaloides ainda se mantém como primeira opção na reanimação volêmica do paciente politraumatizado, segundo o *Advanced Trauma Life Support* (ATLS). Na ausência de resposta ou na resposta transitória ao uso de cristaloides, sugere-se o início do uso de concentrado de hemácias. O modelo proposto previamente incluía a utilização de solução cristalóide em proporção de 3:1 para o volume sanguíneo perdido estimado. Para tal estimativa, utiliza-se a classificação de choque relacionada a perda volêmica derivada de parâmetros clínicos (frequência cardíaca, pressão arterial, frequência respiratória, débito urinário e nível de consciência). Tal

análise estima a hemorragia em classes I, II, III e IV, que correspondem a hemorragia < 15%, 15-30%, 30-40% e > 40%, respectivamente ^(9, 29).

A solução cristalóide preconizada é o Ringer Lactato (RL) e a modalidade de infusão inclui o seu uso aquecido. O uso de solução salina a 0,9% e de colóides na abordagem inicial é desencorajado na literatura, exceto na presença de TCE ^(28, 30, 31). Entretanto, o volume proposto inicialmente tem sido contestado, quando estudos propõem o uso de menor volume na abordagem inicial ⁽³²⁻³⁴⁾. Há alguns estudos sugerindo maior morbidade e mortalidade quando quantidades excessivas de solução cristalóide é administrada ^(31, 35). Hussmann e cols. observaram, em estudo retrospectivo, maior sobrevida nos pacientes que receberam quantidade menor de volume (<1500 mL) no ambiente pré-hospitalar ⁽³⁶⁾. Maegele e cols. utilizando a mesma base de dados observaram presença de coagulopatia em 40% dos pacientes que receberam até 2.000 mL de cristalóides, em 50% até 3.000 mL e até 70% nos que receberam mais de 5.000 mL ⁽²⁵⁾. Em estudos prévios, o uso do RL foi associado a efeitos deletérios, principalmente na ativação da resposta inflamatória ^(37, 38). A recomendação da manutenção dos níveis pressóricos com pressão arterial sistólica (PAS) até 90 mmHg, apesar de não possuir níveis de evidências gerados por estudos clínicos randomizados, está presente em *guidelines* atuais ^(7, 30, 31).

Adicionalmente, recentemente o termo “reanimação hemostática” surgiu, quando, na necessidade de recuperação agressiva do quadro hemodinâmico, a transfusão precoce de hemoderivados está indicada ^(39, 40). As proporções ideais entre a quantidade de concentrados de hemácias (CH),

unidades de plasma fresco congelado (PFC) e plaquetas ainda está em análise da literatura, na tentativa de se esclarecer o maior benefício dessa proposta ⁽⁴¹⁾.

O estudo CRASH-2 ⁽⁴²⁾ revelou adicionalmente uma nova linha de abordagem, com o uso de fármacos associados à reanimação, fazendo uso de ácido tranexâmico precocemente em pacientes submetidos a transfusão maciça, com redução da mortalidade quando usado nas primeiras 3 horas. Desde a ação direta na coagulação, ou ainda, através da modulação da resposta inflamatória, essa forma de reanimação pode-se fazer ainda mais importante onde a escassez de hemoderivados ou a ausência de protocolos se fizer presente.

A pentoxifilina (PTX), derivada da metilxantina, melhora o fluxo sanguíneo na microcirculação devido às suas propriedades hemorreológicas e diminui a atividade inflamatória agindo na ativação neutrofílica e na produção de TNF- α , com diminuição da mesma ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. Há efeitos descritos como atenuação do *burst* oxidativo dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) ⁽⁴⁶⁾, inibição da proliferação de mononucleares e atenuação da liberação de IL-12. Ainda mais, há inibição da citotoxicidade dos linfócitos T, diminuição dos níveis de IFN- γ e secreção de IL-6, além de atenuar a expressão de receptores de IL-2 na superfície celular ^(43, 47-50). Os efeitos imunomoduladores da PTX foram demonstrados em condições clínicas associadas à hiperinflamação. Em modelos experimentais de sepse ⁽⁵¹⁻⁵³⁾, a PTX mostrou diminuir a lesão pulmonar e hepática ^(45, 54), bem como os níveis de citocinas pró-inflamatórias ⁽⁴⁹⁾. Entretanto, esses efeitos não foram explorados em todos

os cenários experimentais ou em estudos clínicos até o momento ⁽⁵⁵⁾. Não foram encontrados estudos sobre o uso da pentoxifilina no contexto experimental ou clínico do politraumatismo.

As dificuldades inerentes ao uso de hemoderivados em nosso meio relacionadas ao seu custo, disponibilidade, armazenamento e complicações associadas à transfusão de hemoderivados e hemocomponentes podem impulsionar o estudo de uma reanimação associada a fármacos com o propósito de atenuar morbidade e/ou mortalidade até que o controle definitivo da hemorragia seja atingido.

No cenário de choque hemorrágico associado a múltiplos traumas, em que se observa alteração da resposta inflamatória e da perfusão tecidual, levando-se em conta as propriedades hemorreológicas e antiinflamatórias da PTX, decidiu-se verificar a hipótese de atenuação das repercussões sistêmicas do choque hemorrágico e a repercussão na coagulopatia do uso da PTX em modelo suíno com múltiplos traumas.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da pentoxifilina associada à reanimação volêmica sobre parâmetros hemodinâmicos e da coagulação em modelo suíno de choque hemorrágico e politrauma.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada em concordância aos princípios internacionais da experimentação em animais e a Lei 11.794/ 2008 para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório ⁽⁵⁶⁾. O projeto foi aprovado, em 2014, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Departamento de Cirurgia e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número 073/14.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica, LIM-62 e no Laboratório de Anestesiologia, LIM-08 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 Amostra

Foram utilizados 23 suínos, machos, mestiços da raça Landrace com peso médio de 28,5 kg, adquiridos da Empresa Roberto Giannichi Filho – ME, Rua Rômulo Giannichi, 105 – CEP- 08696-555 Suzano – SP – CNPJ- 10.852.634/0001-26. O transporte foi rodoviário com os animais acondicionados individualmente, em caixas plásticas multiperfuradas, adequadas para o transporte de porcos. Os animais foram encaminhados à Faculdade de Medicina da USP no dia da experimentação. Todos os experimentos foram agudos, sob efeito anestésico e analgésico.

Os animais foram submetidos a um período de jejum de alimentos sólidos de 12 horas, antes do experimento, e tiveram livre acesso à água.

3.2 Procedimento anestésico e instrumentalização do animal

Os animais receberam uma solução pré-anestésica intramuscular de quetamina 5 mg/kg e midazolan 0,25 mg/kg, em seguida administrado propofol de 3 a 5 mg/kg intravenoso. Foi realizado intubação orotraqueal e colocação em ventilação mecânica para manutenção da FiO_2 em torno de 40% e inserção de termômetro esofágico. A manutenção da anestesia foi feita com isoflurano 1,5% e o bloqueio muscular com pancurônio na dose 5 microgramas/kg/min.

A instrumentalização consistiu em acesso vascular cirúrgico da veia jugular interna direita para monitorização hemodinâmica, da artéria femoral esquerda para hemorragia, da veia femoral direita para administração de fluidos e tratamento medicamentoso e da artéria femoral direita para controle da pressão arterial média (PAM) e coleta sanguínea. Foi realizado laparotomia mediana, cistostomia, para controle do débito urinário e fechamento temporário com pinças de campo em todos os animais (Figura 1). Após o fim da instrumentalização, foi realizada a primeira coleta de amostras para análises laboratoriais, no presente texto chamada **Coleta Início**.

Notar dissecação em região cervical e crural (bilateralmente). Fechamento temporário com pinças. FONTE: Autoria Própria, 2017.

Figura 1 - Fotografia do animal após instrumentalização

3.3 Procedimento Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente (sorteio realizado antes do início da anestesia) em 3 grupos, a saber:

Grupo RL (n=5), tratado na fase de reanimação volêmica com apenas RL; Grupo PTX (n=7), tratado na fase de reanimação volêmica com RL associado a 25 mg/kg de PTX, intravenosa, no início da administração da solução; Grupo Controle (n=5).

O grupo Controle foi submetido ao procedimento anestésico e preparo cirúrgico (instrumentalização do animal), não sendo submetido portanto ao choque hemorrágico ou ao trauma tecidual a que foram submetidos os animais dos outros grupos. As mesmas coletas de exames são realizadas e ao término do procedimento tecidos são coletados para estudo.

Para os outros dois grupos, após a instrumentalização, o animal sofria fratura do fêmur esquerdo através da ampliação da incisão da região crural esquerda, dissecação cruenta da musculatura com posterior identificação do fêmur e sua fratura com costótomo. Para mimetizar o efeito da pistola de gás comprimido do modelo original descrito por Cho e cols. ⁽⁵⁷⁾, um total de duas preensões foi realizada no osso em segmentos adjacentes. Simultaneamente através do acesso da artéria femoral esquerda iniciava-se o choque hemorrágico, com a retirada de 60% do volume sanguíneo total estimado por meio de cálculos previamente descritos (75 mL/kg) ⁽⁵⁸⁾. Durante esse período de hemorragia, se a PAM atingisse níveis inferiores a 30 mmHg, Ringer lactato

era infundido e quantificado. Assim que a PAM atingia 30 mmHg novamente, a infusão era interrompida e a hemorragia reiniciada até que o volume necessário calculado fosse atendido. O tempo médio estimado no modelo original era de 20 minutos. Após a sangria prevista, o animal era mantido em choque por 30 minutos. Neste período nenhum fluido foi administrado. Realizava-se nova coleta de amostras para análises laboratoriais, aqui chamada **Coleta Pós-hemorragia**.

A fase que simula o atendimento pré-hospitalar era iniciada e todos os animais (exceto os do grupo Controle) eram tratados com reposição volêmica de acordo com o sorteio. Os animais do grupo PTX receberam 25 mg/kg de pentoxifilina injetável junto ao primeiro frasco de RL.

O volume retirado na hemorragia foi repostado com RL na proporção 3:1 (para cada 1 mL de sangue retirado no choque, 3 mL de RL era infundido). A solução infundida era resfriada em geladeira previamente a 4 °C, e o alvo de temperatura do animal durante a fase de reanimação era de 32 a 34 °C (hipotermia moderada)⁽⁵⁹⁾. Se durante a hemorragia foi necessário o uso de RL, esse foi subtraído do volume total calculado para reposição, a fim de que o volume ofertado nessa fase somado ao anterior não ultrapassasse o volume total calculado na proporção acima. Um período de 15 minutos era necessário para estabilização e, posteriormente, era realizada coleta de amostras para as análises laboratoriais, chamada nessa fase de **Coleta Pós-reanimação**.

Em seguida, o trauma abdominal visceral era iniciado, para simular a ruptura tardia de um hematoma contido. Foi realizada uma lesão hepática padronizada, de grau IV (Figura 2) segundo a ISS da Associação Americana

de Cirurgia de Trauma (AAST). Aguardava-se a lesão hepática sangrar por 30 segundos (simulando uma hemorragia não-controlada) e o fígado era submetido ao “empacotamento” com seis compressas, e com o fim da hemorragia não controlada era realizada coleta de amostras para as análises laboratoriais, chamada **Coleta Pós-lesão hepática**.

Nota: A lesão envolve pelo menos dois segmentos hepáticos, o segmento 5 e o segmento 8, segundo a AIS. FONTE: Autoria Própria, 2017

Figura 2 - Fotografia do lobo hepático médio direito após lesão

Os animais foram monitorizados e observados por duas horas. Após esse período, nova coleta de amostras para as análises laboratoriais era realizada (Coleta Final). De forma padronizada foi realizada então coleta de tecido hepático (lobo esquerdo, 2x2 cm) e lobo inferior do pulmão direito (3x3 cm). As compressas do tamponamento hepático são retiradas e pesadas para quantificar o sangramento hepático (do peso total das compressas é subtraído

o peso seco das compressas em gramas. Para efeito de análise converteu-se o peso em gramas para volume em mililitros, de forma direta, aproximada). Ao término do período o experimento era finalizado e os animais submetidos a eutanásia ainda sob anestesia, por meio da injeção de cloreto de potássio 19,1% (Figura 3).

3.4 Variáveis fisiológicas

Durante todo o experimento, foram coletados os seguintes dados: frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), saturação de oxigênio e temperatura.

Adicionalmente, foram colhidos outros parâmetros, não apresentados no presente estudo. Pressão arterial sistólica e diastólica, débito cardíaco, saturação venosa central e outros dados do Swan-Ganz foram tabulados para eventuais posteriores análises.

3.5 Análises laboratoriais

As amostras sanguíneas foram coletadas da artéria femoral direita, previamente canulada na fase de instrumentalização. Prontamente, 20 mL de sangue foram distribuídos em um frasco seco, dois frascos com EDTA, uma seringa heparinizada e três frascos com citrato de potássio. Um dos frascos citratados era utilizado *in loco* na análise do ROTEM®. O restante das amostras foi encaminhado ao Laboratório de Análises Especiais, LIM 03.

Foram medidos os seguintes parâmetros: sódio, potássio, hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), plaquetas, pH, bicarbonato (HCO_3), excesso de bases (BE), lactato e fibrinogênio.

Adicionalmente, foram realizados outros testes laboratoriais, não apresentados no presente estudo. Aspartato amino-transferase, alanina amino-transferase, uréia, creatinina, bilirrubinas, fosfatase alcalina, gama glutamil-transferase e amilase foram tabulados para eventuais posteriores análises.

A análise do hemograma foi feita no Aparelho pocH 100iv Diff (Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Alemanha) pelo método automatizado, com estudo morfológico e leitura do diferencial leucocitário em esfregaço sanguíneo corado com corantes panópticos, complementando o exame.

Figura 3 - Delineamento do estudo

As análises bioquímicas foram feitas no Aparelho Cobas c111 (ROCHE, Indianápolis, USA) e os seguintes métodos utilizados: ALT- cinético UV; AST- cinético UV; GGT- enzimático colorimétrico; Fosfatase Alcalina- colorimétrico; Bilirrubina Total e Frações - colorimétrico; Ureia- Cinético UV, por ação da urease; Creatinina- enzimático colorimétrico baseado no método Jaffé; Amilase- enzimático colorimétrico.

A análise da gasometria arterial foi feita no aparelho ABL 800 FLEX (Radiometer, Copenhagen, Dinamarca) e a metodologia utilizada de eletrodos de íon seletivo.

A análise da coagulação foi feita no aparelho Start 4 (Diagnóstica Stago S.A.S - Asnières sur Seine, França). E os seguintes métodos utilizados: TP- Quick modificado; TTPA- Proctor & Rapaport modificado; Fibrinogênio- Clauss modificado e Atividade da Proteína C- amidolítico com substrato cromogênico.

Tromboelastometria

A tromboelastometria foi realizada no aparelho ROTEM®, (Pentapharm GmbH, Munique, Alemanha) pela via EXTEM. O sangue analisado foi arterial, colhido em seringa e armazenado em tubo com citrato de potássio. O tempo máximo para realização do exame após a coleta foi de 2 horas. O sangue total citratado é colocado numa cuveta a 37 °C com um pino suspenso dentro dela e conectado a um sistema de detecção óptica. A cuveta e o pino sofrem um movimento de oscilação relativa entre eles de 4°45' e, à medida que o coágulo se forma, as fibras de fibrina ligam as paredes da cuveta ao pino. A impedância de rotação do pino é detectada e um gráfico é gerado (Figura 4).

O sangue é colocado no cuvette com um pino suspenso dentro dele e conectado a um sistema de detecção óptica. A cuvette e o pino sofrem um movimento de oscilação relativa entre eles de $4^{\circ}75'$ e a medida que o coágulo se forma as fibras de fibrina ligam as paredes da cuvette ao pino. Modificado de imagem disponível do site do fabricante em: <https://www.rotem-usa.com/methodology/thromboelastometry/>.

Figura 4 - Ilustração do mecanismo de funcionamento da tromboelastometria (ROTEM®)

Os parâmetros da tromboelastometria analisados foram os seguintes:

1. CT (*clotting time*): intervalo de tempo em segundos desde o início do teste até o início da coagulação (quando a curva atinge 2 mm de amplitude), reflete o tempo gasto para a geração de fibrina e a ativação dos fatores de coagulação.
2. CFT (*clot formation time*): tempo em segundos entre o início da coagulação até a curva atingir a amplitude de 20 mm. Representa a cinética de formação do coágulo.
3. ALFA (ângulo alfa): medida em graus do ângulo formado entre a linha de base e a tangente da curva com 2 mm de amplitude. Indica também a aceleração e a cinética da formação do coágulo e da rede de fibrina de modo a que quanto maior o ângulo, maior será a taxa de geração de fibrina.
4. A10: amplitude do coágulo em milímetros 10 minutos após o início da coagulação.
5. MCF (*maximum clot firmness*): é o ponto de maior amplitude da curva medido em milímetros e representa a força máxima do coágulo, refletindo a interação entre as plaquetas e a rede de fibrina. Está diretamente relacionado à concentração e função plaquetária e à quantidade de fibrinogênio.
6. MCFT (*maximum clot firmness time*): tempo gasto em segundos para a curva atingir a amplitude máxima.
7. MAXV (*maximum velocity*): mede a velocidade ou a taxa máxima de formação do coágulo em milímetros/segundo.

8. ML (*maximum lysis*): lise máxima do coágulo em milímetros.

3.6 Análise estatística

As informações coletadas foram digitadas em um banco de dados desenvolvido nos programas Microsoft Excel® 2016. Os gráficos apresentados foram gerados com o auxílio do programa R (versão 3.1.2). Adotou-se o nível de significância de 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade, e níveis descritivos (p) iguais ou inferiores a esse valor foram considerados significantes.

Em razão do pequeno tamanho amostral, em todos os testes de hipótese foram utilizadas técnicas não paramétricas. O teste Levene foi aplicado para verificar a homogeneidade das variâncias das medidas entre os grupos de tratamento. Em caso positivo (não se rejeitou a homogeneidade de variância), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, para verificar se, pelo menos, um dos grupos de tratamento possuía comportamento diferente das medidas clínicas. Para os casos em que foi rejeitado o teste de Levene (p-valor < 0,05), em que, pelo menos, um dos grupos possuía medidas clínicas diferentes (teste de Kruskal-Wallis, p-valor < 0,05), utilizou-se o teste de comparações múltiplas para ver quais tratamentos diferiam entre si (teste de Tukey no paramétrico)⁽⁶⁰⁾.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Para efeitos de interpretação, os resultados foram apresentados em grupos, a saber: mortalidade, parâmetros gerais, hemodinâmicos, hemograma, parâmetros de coagulação, tromboelastometria e gasometria.

4.1 Mortalidade

A mortalidade do experimento foi de 26% (6 entre 23 porcos). Esses 6 animais foram substituídos para a análise, pois o óbito ocorreu devido ao modelo experimental, em fase subsequente à hemorragia.

4.2 Parâmetros gerais

Peso

O peso médio dos animais (em kg) foi de $28,55 \pm 3,85$ e os valores por grupos estão expressos no apêndice.

Hemorragia da lesão hepática

O sangramento da fase da lesão hepática, que simula uma hemorragia não controlada, foi estimado através do peso das compressas utilizadas no tamponamento após a lesão. Do peso total, foi extraído o peso das compressas secas (Tabela 1).

Tabela 1 - Volume do sangramento estimado (peso total das compressas após sangramento - peso seco das compressas), em mL/kg, e desvio-padrão da amostra

Grupos	n	Volume estimado sangramento hepático (mL/kg)	Desvio Padrão
Controle	5	0*	0*
RL	5	9,4	4,6
PTX	7	11	4,8

*; notar que o valor não foi expresso no grupo Controle, não submetido a sangramento.

Temperatura

No início dos experimentos, todos os animais apresentaram a temperatura registrada pelo termômetro do cateter de Swan-Ganz superior a 36,8 °C. Após a fase de choque hemorrágico (Tempo 2) os animais submetidos à sangramento e trauma músculo-esquelético não apresentaram hipotermia. Após a fase de reanimação volêmica, os animais submetidos a reanimação volêmica com RL e PTX apresentaram diminuição da temperatura, com significância estatística (Figura 5 e Tabela 2).

Tabela 2 - Valores da temperatura (expressos em graus Celsius, média) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Tempos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	38,5 ± 0,2	37,8 ± 0,6	37,9 ± 0,4	0,40
Pós-choque	38,2 ± 0,4	37,6 ± 2,3	38,5 ± 1,4	0,65
Pós-reanimação	38 ± 0,5	34,2 ± 0,9*	34,6 ± 0,7*	0,006
Pós-lesão hepática	37,8 ± 0,6	34,1 ± 0,6*	34,7 ± 0,6*	0,004
Final	37,5 ± 0,8	34,5 ± 1*	35,2 ± 0,7*	0,005

*; Notar a diminuição da temperatura nos tempos 3, 4 e 5 nos grupos RL e RL+PTX.

*; Notar a diminuição da temperatura nos tempos 3, 4 e 5 nos grupos que receberam RL (p<0,05).

Figura 5 - Valores em graus Celsius (°C) da temperatura por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

4.3 Parâmetros hemodinâmicos

Frequência cardíaca (FC)

No primeiro momento da análise (tempo Início) os grupos não apresentavam diferença estatística entre si, com frequência cardíaca (FC) média inicial de 107 batimentos por minuto (BPM). A partir do segundo momento (tempo Pós-choque), os grupos RL e PTX apresentaram variação da FC com significado estatístico, quando comparados ao grupo controle (Tabela 3 e Figura 6). Não houve significância estatística entre os grupos de tratamento.

*; $p < 0,05$ em PTX e RL versus Controle.

Figura 6 - Curvas de FC durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

Tabela 3 - Valores da FC (expressos em BPM - média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Grupos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	102 $\pm$ 20	110 $\pm$ 24	108 $\pm$ 19	0,83
Pós-choque	105 $\pm$ 14	207 $\pm$ 24	237 $\pm$ 23	0,002
Pós- reanimação	115 $\pm$ 13	177 $\pm$ 35	203 $\pm$ 27	0,005
Pós-lesão hepática	120 $\pm$ 17	185 $\pm$ 32	194 $\pm$ 10	0,006
Final	144 $\pm$ 31	178 $\pm$ 38	187 $\pm$ 22	0,07

Pressão arterial média (PAM)

No primeiro momento da análise (tempo Início) os grupos apresentavam PAM semelhantes, com PAM superiores a 60 mmHg (Figura 7, Tabela 4). A partir do segundo momento (pós-choque), todos os grupos apresentaram variação da PAM com significado estatístico, quando comparados ao grupo controle. O grupo PTX teve aumento de PAM no pós-reanimação, quando comparado ao grupo RL ($p < 0,05$). Não houve significância estatística entre os grupos de tratamento nos tempos pós-lesão hepática e final.

Figura 7 - Curvas da pressão arterial média (PAM) durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

Tabela 4 - Valores da PAM (expressos em mmHg – média ± desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Grupos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	76 ± 9	90 ± 16	71 ± 6	0,87
Pós-choque	82 ± 13	42 ± 25	48 ± 9	0,01
Pós- reanimação	82 ± 14	41 ± 7	52 ± 6	0,01
Pós-lesão hepática	82 ± 11	37 ± 14	43 ± 10	0,005
Final	85 ± 20	43 ± 20	33 ± 8	0,008

*; Notar o aumento da PA após reanimação no grupo PTX vs RL no tempo pós-reanimação (p<0,05).

4.4 Hemograma

Hemoglobina

Os animais submetidos à hemorragia (grupos RL e PTX) mostraram diminuição dos níveis de hemoglobina (Hb), quando comparados ao grupo Controle nos mesmos tempos após a fase pós-choque. Não houve diferença estatística entre os 3 grupos entre si (Tabela 5, Figura 8).

Tabela 5- Valores da hemoglobina (expressos em mg/dL, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	8,9 $\pm$ 1,2	7,9 $\pm$ 1,8	8,8 $\pm$ 1,1	0,47
Pós-choque	9 $\pm$ 1,2	7,1 $\pm$ 2,7	8,9 $\pm$ 0,6	0,53
Pós- reanimação	9,1 $\pm$ 1,1	6,1 $\pm$ 2,6	6,3 $\pm$ 0,6	0,02
Pós-lesão hepática	9,1 $\pm$ 1	5,6 $\pm$ 1,4	6,5 $\pm$ 1,1	0,01
Final	10,7 $\pm$ 2,8	6,7 $\pm$ 2,4	6,2 $\pm$ 1,3	0,02

*; notar a queda da Hb nos grupos com choque hemorrágico após o tempo 3 quando comparados ao grupo controle

Figura 8 - Valores de Hb em g/dL por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação: Início, Pós-choque, Pós-reanimação, Pós-lesão hepática e Final

Hematócrito

Os animais submetidos à hemorragia (grupos RL e PTX) mostraram diminuição dos níveis de hematócrito (Ht), quando comparados ao grupo Controle nos mesmos tempos (Tabela 6), com valores mais baixos alcançados no tempo 3 e 4 (pós-reanimação) nos grupos RL e PTX, com $p < 0,05$ (Tabela e Figura 9).

Tabela 6 - Valores do hematócrito (expressos em %, de média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	29 $\pm$ 3,2	26,5 $\pm$ 4,3	29,2 $\pm$ 3,2	0,71
Pós-choque	28,9 $\pm$ 3,3	24,2 $\pm$ 7,9	30,3 $\pm$ 2,1	0,33
Pós- reanimação	29,4 $\pm$ 3,0	20,6 $\pm$ 8,4	21,8 $\pm$ 2,2	0,02
Pós-lesão hepática	29,8 $\pm$ 2,7	19,3 $\pm$ 4,6	22,6 $\pm$ 3,8	0,01
Final	33,9 $\pm$ 6,5	22,5 $\pm$ 7,2	21,6 $\pm$ 4,3	0,02

*; notar a queda da Ht nos grupos com choque hemorrágico após o tempo 3 quando comparados ao grupo controle.

Figura 9 - Valores de hematócrito (%) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação: Início, Pós-choque, Pós-reanimação, Pós-lesão hepática e Final

4.5 Gasometria

pH

Todos os animais submetidos ao protocolo de lesão e choque hemorrágico apresentaram redução do pH, com valores estatisticamente significativos em todos os tempos após a hemorragia (pós-choque, pós-reanimação, pós-lesão hepática e final) quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos submetidos a tratamento (Tabela 7, Figura 10).

Tabela 7 - Valores do pH (média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	7,45 $\pm$ 0,06	7,4 $\pm$ 0,06	7,45 $\pm$ 0,04	0,3
Pós-choque	7,46 $\pm$ 0,05	7,15 $\pm$ 0,11	7,31 $\pm$ 0,06	0,002
Pós- reanimação	7,46 $\pm$ 0,04	7,15 $\pm$ 0,14	7,22 $\pm$ 0,07	0,003
Pós-lesão hepática	7,47 $\pm$ 0,03	7,2 $\pm$ 0,15	7,28 $\pm$ 0,05	0,007
Final	7,48 $\pm$ 0,03	7,3 $\pm$ 0,09	7,25 $\pm$ 0,04	0,007

*Notar decréscimo do pH no pós-choque.

Figura 6 - Valores do pH, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

Excesso de Bases (BE)

Os grupo RL e PTX apresentaram piora do BE a partir da hemorragia, com valores significativamente negativos até o tempo 5. Não houve diferença entre os grupos com intervenção (Tabela 8 e Figura 11).

Tabela 8 - Valores do BE (expressos em mmol/L, média $\pm$ desvio-padrão), nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	3,7 $\pm$ 1,9	1,3 $\pm$ 2,5	3,3 $\pm$ 1,5	0,25
Pós-choque	3,8 $\pm$ 2,2	-16,1 $\pm$ 5,7	-7,4 $\pm$ 5,8	0,002
Pós- reanimação	4,3 $\pm$ 2,2	-13,9 $\pm$ 7,9	-8,9 $\pm$ 4,8	0,004
Pós-lesão hepática	4,6 $\pm$ 2,6	-13,6 $\pm$ 8	-8,7 $\pm$ 5	0,004
Final	5,8 $\pm$ 2,1	-6,7 $\pm$ 4,5	-11,2 $\pm$ 8,2	0,008

Figura 11 - Valores do BE, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

Bicarbonato (HCO_3)

Os grupos RL e PTX apresentaram piora do HCO_3 após a hemorragia, com valor estatístico significativo quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$) (Tabela 9 e Figura 12).

Tabela 9 - Valores do HCO_3^- , (expressos em mmol/L, média $\pm$ desvio-padrão), nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	27,5 $\pm$ 2,2	25,7 $\pm$ 2,2	27 $\pm$ 1,6	0,44
Pós-choque	27,2 $\pm$ 2,8	11,8 $\pm$ 4,4	17,6 $\pm$ 5,5	0,004
Pós- reanimação	27,8 $\pm$ 3,1	14 $\pm$ 5,9	17,3 $\pm$ 4,2	0,007
Pós-lesão hepática	27,9 $\pm$ 2,2	13,2 $\pm$ 5,7	16,7 $\pm$ 4,5	0,005
Final	29,3 $\pm$ 2,8	18,7 $\pm$ 2,9	11 $\pm$ 7,8	0,006

Figura 12 - Valores do HCO_3^- , em mmol/L, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

Lactato

Os grupos RL e PTX apresentaram piora do lactato após a hemorragia, com valor estatístico significativo quando comparado ao grupo Controle até o tempo Final ($p < 0,05$). No tempo Final, o grupo RL teve melhora do lactato quando comparado ao grupo PTX ($p < 0,05$) (Tabela 10 e Figura 13).

Tabela 10 - Valores do lactato, (expressos em mmol/L, média $\pm$ desvio-padrão), nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	1,4 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,4	0,35
Pós-choque	1,5 $\pm$ 0,4	11,6 $\pm$ 3,4	7 $\pm$ 3,2	0,002
Pós- reanimação	1,6 $\pm$ 0,6	11,9 $\pm$ 3,9	9,1 $\pm$ 2,4	0,003
Pós-lesão hepática	1,6 $\pm$ 0,5	12,5 $\pm$ 4	9,4 $\pm$ 2,7	0,003
Final	1,2 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 2,7	13,5 $\pm$ 2,7	0,004

*; tempo final, RL teve melhora do lactato quando comparado ao grupo PTX ($p < 0,05$)

Figura 13 - Valores do lactato, em mmol/L, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

4.6 Parâmetros de coagulação

Tempo de Protrombina /INR

No tempo Final, os grupos RL e PTX tiveram aumento dos valores quando comparados ao grupo Controle ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos RL e PTX (Tabela 11 e Figura 14).

Tabela 11 - Valores do INR (expressos em razão $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	1,3 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3	0,31
Pós-choque	1,2 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,3	0,16
Pós- reanimação	1,2 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,4	0,44
Pós-lesão hepática	1 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,3	0,12
Final	1,1 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 2,3	0,01

Figura 14 - Valores de INR, expresso pela sua média, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

Tempo de Protrombina (segundos)

Não houve variação no TP com significância estatística entre os grupos submetidos a tratamento (Tabela 12 e Figura 15).

Tabela 12 - Valores do TP (expressos em segundos, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	14,4 $\pm$ 2,4	14,4 $\pm$ 2,4	15,8 $\pm$ 2,3	0,31
Pós-choque	13,7 $\pm$ 1,7	14,9 $\pm$ 3,2	15,3 $\pm$ 2,4	0,16
Pós- reanimação	14,1 $\pm$ 2	15,6 $\pm$ 3,2	15,6 $\pm$ 3,4	0,44
Pós-lesão hepática	13,5 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3,7	17,4 $\pm$ 2,5	0,12
Final	13 $\pm$ 1,7	16,5 $\pm$ 2,8	23,9 $\pm$ 15,2	0,01

Figura 15 - Valores de TP, em segundos, por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Não houve diferença estatística na análise do TTPA, quando comparados os tempos dentro do mesmo grupo ou nas análises entre grupos (Tabela 13, Figura 16).

Tabela 13 - Valores do TTPA (expressos em segundos, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	45,3 $\pm$ 25,7	26,4 $\pm$ 13,4	41,8 $\pm$ 29,9	0,42
Pós-choque	38,2 $\pm$ 7,7	41,7 $\pm$ 20,4	40,1 $\pm$ 24	0,92
Pós- reanimação	31,1 $\pm$ 9,6	26,7 $\pm$ 17,7	28 $\pm$ 10,5	0,56
Pós-lesão hepática	36,1 $\pm$ 16,7	22,4 $\pm$ 9,5	36,6 $\pm$ 22,9	0,41
Final	34,2 $\pm$ 5,3	42,1 $\pm$ 22,4	38,1 $\pm$ 48,7	0,21

Figura 16 - Valores do TTPA (expresso em segundos) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

4.7 Tromboelastometria

Em todos os testes viscoelásticos, caracterizou-se diferença entre os grupos RL e PTX quando comparados ao grupo Controle, a partir da fase pós-reanimação.

Clotting time (CT)

Na fase pós-reanimação volêmica, houve aumento do CT nos grupos RL e PTX ($p < 0,05$) (Figura 17). O mesmo grupo RL quando comparado ao grupo PTX, apresentou menores valores do CT no tempo 5, com $p < 0,05$ (Tabela 14).

Figura 17 - Valores do CT (expresso em segundos) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

Tabela 14 - Valores do CT (expressos em segundos, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	41,2 $\pm$ 4,6	51,8 $\pm$ 10,1	53 $\pm$ 5,8	0,08
Pós-choque	42,2 $\pm$ 8,8	52 $\pm$ 5,8	54,3 $\pm$ 7,5	0,04
Pós- reanimação	45 $\pm$ 2,8	58 $\pm$ 1,9	51,4 $\pm$ 5	0,005
Pós-lesão hepática	47,4 $\pm$ 2,3	53 $\pm$ 2,3	55,7 $\pm$ 7,7	0,01
Final	45,7 $\pm$ 2	36,5 $\pm$ 19,1	49,8 $\pm$ 7,1	0,03

Clotting formation time (CFT)

Nesse parâmetro, após a fase pós-reanimação, os grupos RL e PTX apresentaram aumento dos valores quando comparados ao grupo Controle, com diferença significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença com significância estatística entre os grupos submetidos a tratamento (Tabela 15, Figura 18).

Tabela 15 - Valores do CFT (expressos em segundos, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	33 $\pm$ 5,8	35,8 $\pm$ 7,2	39,6 $\pm$ 4,7	0,14
Pós-choque	33,4 $\pm$ 3,9	53,6 $\pm$ 11,1	39,1 $\pm$ 4,8	0,04
Pós- reanimação	34 $\pm$ 1,4	66,4 $\pm$ 13,5	53,7 $\pm$ 13,7	0,04
Pós-lesão hepática	39,2 $\pm$ 2,4	63,6 $\pm$ 14,7	51,1 $\pm$ 14,1	0,002
Final	38,5 $\pm$ 2,1	56,2 $\pm$ 14	52,1 $\pm$ 9,2	0,05

†; notar a diferença nos tempos 3, 4 e 5 entre os grupos RL e PTX versus Controle

Figura 18 - Valores do CFT (expresso em segundos) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

Maximum Clot Firmness (MCF)

Nesse parâmetro, após a fase pós-reanimação, os grupos RL e PTX apresentaram diminuição dos valores quando comparados ao grupo Controle, com diferença significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença com significância estatística entre os grupos submetidos a tratamento (Tabela 16 e Figura 19).

Tabela 16 - Valores do MCF (expressos em milímetros, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos.

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	82 $\pm$ 3,3	78,6 $\pm$ 3,6	76,1 $\pm$ 1,2	0,26
Pós-choque	78,4 $\pm$ 3,6	74 $\pm$ 3,4	75,3 $\pm$ 1,6	0,25
Pós- reanimação	80,5 $\pm$ 4,5	68,4 $\pm$ 2,1	70,4 $\pm$ 2,5	0,007
Pós-lesão hepática	80,4 $\pm$ 2,6	69,2 $\pm$ 1,9	71 $\pm$ 2,8	0,005
Final	82 $\pm$ 0,8	77,2 $\pm$ 9,2	71,8 $\pm$ 2,6	0,005

Figura 19 - Valores do MCF (expresso em milímetros) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

Ângulo alfa

Nesse parâmetro, após a fase pós-reanimação, os grupos RL e PTX apresentaram diminuição dos valores quando comparados ao grupo Controle, com diferença significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença com significância estatística entre os grupos submetidos a tratamento.

Tabela 17 - Valores do ângulo alfa (expressos em graus, mediana) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	84 ± 1,2	83 ± 1,6	82,3 ± 0,7	0,1
Pós-choque	83,4 ± 0,9	80,2 ± 1,8	82,3 ± 1,8	0,007
Pós- reanimação	83,5 ± 0,6	77,4 ± 1,9	79,4 ± 1,4	0,006
Pós-lesão hepática	83,2 ± 0,4	78,2 ± 2,6	79,9 ± 0,7	0,003
Final	83,5 ± 0,6	80,7 ± 6,8	79,9 ± 1,7	0,07

†; notar valores nos tempos 3 , 4 e 5 nos grupos RL e PTX ; os 2 grupos tiveram valores menores nos tempos 3,4 e 5 quando comparados ao Controle ($p < 0,01$).

Figura 20 - Valores do ângulo alfa (expresso em graus) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

A10

Nesse parâmetro, após a fase pós-reanimação, os grupos RL e PTX apresentaram diminuição dos valores quando comparados ao grupo Controle, com diferença significativa ($p < 0,05$). No tempo Final, o grupo RL teve aumento quando comparado ao grupo PTX ($p < 0,05$).

Tabela 18 - Valores do A10 (expressos em milímetros, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	81,4 $\pm$ 3,3	77,4 $\pm$ 4,3	75,4 $\pm$ 1,1	0,07
Pós-choque	77,6 $\pm$ 3,3	71,6 $\pm$ 4	74 $\pm$ 1,8	0,09
Pós- reanimação	79 $\pm$ 3,4	65 $\pm$ 2,1	67,3 $\pm$ 2	0,006
Pós-lesão hepática	79,8 $\pm$ 2,7	66,6 $\pm$ 1,8	68,2 $\pm$ 2,7	0,005
Final	81,7 $\pm$ 1,2	75 $\pm$ 10,5	68 $\pm$ 3,08	0,01

†; notar valores no tempo 5 no grupo RL; os 2 grupos tiveram valores menores nos tempos 3,4 e 5 quando comparados ao Controle ($p < 0,01$)

Figura 21 - Valores do A10 (expresso em milímetros) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

ML

Nesse parâmetro, após a fase pós-reanimação, os grupos RL e PTX apresentaram diminuição dos valores quando comparados ao grupo Controle, com diferença significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença com significância estatística entre os grupos submetidos a tratamento.

Tabela 19 - Valores da ML (expressos em %, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	12,8 $\pm$ 3,2	12,6 $\pm$ 3,6	11 $\pm$ 1,5	0,69
Pós-choque	16 $\pm$ 2,8	9,8 $\pm$ 4	10,9 $\pm$ 2	0,02
Pós- reanimação	13,5 $\pm$ 3	9,6 $\pm$ 4,3	9,1 $\pm$ 3,1	0,12
Pós-lesão hepática	13,8 $\pm$ 3	9,4 $\pm$ 4,1	9 $\pm$ 3,8	0,04
Final	12,3 $\pm$ 2,3	6,5 $\pm$ 4,7	8,3 $\pm$ 2,7	0,05

Figura 22 - Valores da ML (expresso em %) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

4.8 Fibrinogênio

No tempo Pós-lesão hepática e Final, os níveis de fibrinogênio do grupo PTX mostrou aumento e seus valores apresentaram-se similares aos níveis do grupo Controle e com diferença significativa quando comparado ao grupo RL (Tabela 20 e Figura 23).

Tabela 20 - Valores do Fibrinogênio (expressos em mg/dl, média $\pm$ desvio-padrão) nos diferentes tempos de avaliação e nos diferentes grupos

Momentos	Controle	RL	PTX	p valor
Início	319 $\pm$ 102	301 $\pm$ 181	533 $\pm$ 248	0,17
Pós-choque	375 $\pm$ 172	245 $\pm$ 151	625 $\pm$ 227	0,16
Pós- reanimação	325 $\pm$ 176	260 $\pm$ 76	331 $\pm$ 204	0,94
Pós-lesão hepática	387 $\pm$ 134	137 $\pm$ 39	433 $\pm$ 127	0,009
Final	392 $\pm$ 67	141 $\pm$ 53	375 $\pm$ 190	0,009

†; notar valores nos tempos 4 e 5 no grupo PTX versus RL, $p < 0,01$

Figura 23 - Valores do Fibrinogênio (expresso em mg/dl) por grupo durante o protocolo nos diferentes tempos de avaliação

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Modelo Experimental

Os modelos experimentais de trauma inicialmente utilizavam do choque hemorrágico como simulador da condição clínica a ser estudada. Recentemente, alguns modelos que incluem a lesão tecidual surgiram após a ampliação do entendimento da fisiopatologia da coagulopatia e da inflamação nos eventos que se seguem a uma lesão grave associada à hemorragia. Em 2008, Bouillon e cols.⁽⁶¹⁾ sugeriram que as características necessárias para um modelo ideal de análise do trauma grave deve ter a associação da coagulopatia e inflamação. A necessidade de que seja um mamífero de maior porte, com sistema de coagulação conhecido, com lesão tecidual significativa associada à hemorragia e subsequente reanimação volêmica com componente dilucional e de hipotermia devem ser preenchidas. Acrescente-se ainda, a ocorrência de acidose e elevação de citocinas inflamatórias e a possibilidade de medir a ocorrência de coagulopatia para compor a gravidade do modelo. Vários modelos e trabalhos são encontrados na literatura mas sua heterogeneidade demonstra a dificuldade em cumprir todos esses preceitos. Parr e cols. em revisão de literatura sobre modelo experimental para estudo da CTA, encontrou uma ampla gama de modelos, avaliando 17 porcos, 5 com ratos, 3 com coelhos, 3 com fetos de coelhos e três estudos únicos com modelos com cães, ovelhas e ratos⁽⁶²⁾.

Modelos porcos são adequados pela possibilidade da realização de procedimentos, tais como lesões mais extensas e grau de hemorragia. Entretanto, o elevado custo para aquisição e manutenção dos animais durante a fase de experimentação, além da dificuldade com a legislação que não permite sua manutenção por mais de 12 horas na zona urbana são dificuldades adicionais ao seu uso associados a problemas éticos e a maior variabilidade intraespecífica ⁽⁶³⁾.

Modelos animais de pequeno porte, como rato e camundongo, são importantes na compreensão dos fenômenos fisiopatológicos e têm sido usados extensamente como modelo experimental, entretanto, recomenda-se o uso do animal de médio porte previamente à aplicação em seres humanos. Em 2010, Rezende-Neto e cols. ⁽⁶⁴⁾ apresentaram estudo brasileiro com a utilização de coelhos no choque hemorrágico associado à lesão de aorta e compararam a reanimação com hipotensão permissiva à reanimação normovolêmica. No modelo apresentado pode-se criticar a ausência de dano tecidual extenso. Bouillon e cols. ⁽⁶¹⁾ assinalam em seu estudo que apesar da utilização de modelos em primatas na avaliação do choque e distúrbios da coagulação, não há modelos que induzam a coagulopatia traumática aguda em primatas até o momento. A possibilidade da utilização de primatas devido à similaridade da espécie com humanos seria desejável e encontraria os pressupostos sugeridos. O estudo de Tsukamoto e cols. ⁽⁶³⁾ sugere que primatas permitem amostras adequadas, são fáceis de instrumentar e geram dados mais semelhantes aos esperados em humanos pela similaridade genética. As desvantagens se encontrariam na variabilidade dos indivíduos, o

custo elevado e as limitações de uso, especialmente associada a razões éticas. Nesses animais a deficiência da coagulação já se inicia quando 20% da volemia é retirada ⁽⁶¹⁾. Até o início desse estudo, não foram encontrados na literatura estudos com a utilização de primatas em trauma. Recentemente, Sheppard e cols. publicaram modelo de trauma associado a hemorragia em macacos Rhesus, avaliando em estudo posterior de perfil inflamatório em hemorragia não-controlada, sugerindo sua adequação para a avaliação de terapêutica da inflamação que se segue ao trauma^(65,66).

O modelo experimental utilizado em nosso estudo foi descrito por Cho e cols. ⁽⁵⁷⁾, em que o suíno é submetido a eventos presentes no paciente politraumatizado, como o choque hemorrágico associado à fratura de extremidade e, ainda, lesão hepática. Durante o choque hemorrágico é possível promover hipotermia, condição descrita previamente como parte da tríade letal do trauma. As fases componentes do estudo buscam simular fases do atendimento do paciente politraumatizado. Após a lesão e o choque, que simulam a fase pré-hospitalar, segue-se uma fase de reanimação volêmica e uma sequência de eventos intra-hospitalares. Em nosso estudo, a fratura do fêmur sofreu adaptação e foi realizada com instrumento distinto do proposto originalmente. A similaridade do modelo com a realidade da prática médica torna-o propício para análises de terapias pré-clínicas.

Os animais submetidos aos experimentos, RL e PTX, apresentaram acidose e hipotermia após a hemorragia (pós-choque) que foi ainda mais acentuada após a reanimação volêmica proposta (pós-reanimação volêmica). O bicarbonato sérico, lactato e excesso de bases foram comparativamente

piores nos grupos experimentais quando comparados ao grupo Controle. A resposta hemodinâmica foi também significativa, e os grupos submetidos ao experimento apresentaram grave hipotensão e taquicardia, apenas parcialmente corrigidas pelo protocolo de reanimação proposto.

No presente trabalho, a reprodutibilidade do modelo mostrou-se evidente quando os resultados preliminares apontaram a ocorrência de profundos efeitos hemodinâmicos e a mortalidade de 21,7% mostra a gravidade da situação clínica simulada. Resultados de mortalidade semelhante foram em outros estudos semelhantes ^(67, 68).

5.2 Uso de cristaloides versus hemocomponentes

A literatura mais recente sugere, ainda sem modelo consagrado, que tão logo seja possível, na existência de hemorragia severa, inicie-se a administração de hemocomponentes. Protocolos de transfusão maciça estão disponíveis e são o padrão em diversas instituições, nacionais e internacionais ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. Os modelos experimentais consultados para a elaboração do presente trabalho não apresentam a precoce administração de sangue total ou hemocomponentes, associado a menores volumes de solução cristalóide. Trabalhos experimentais prévios com modelos porcos com trauma e hemorragia associados utilizam da hemodiluição como fator essencial para a instalação da CTA e da inflamação. Outrossim, a hipotermia alvo do experimento é alcançada com a infusão de solução cristalóide resfriada ou com a lavagem da cavidade peritoneal com solução fria. Em análise de estudo

que visa avaliar a proporção ideal de plasma fresco congelado e concentrado de hemácias, associado ou não com a transfusão de plaquetas, comparando-a ainda com o uso de sangue total, como publicado em 2009 por Alam e cols.⁽⁶⁷⁾, a proporção utilizada para o cálculo da reposição era de 3 ml de solução cristaloide para cada 1 ml de sangue retirado na fase da hemorragia, assim como proposto previamente no ATLS⁽⁹⁾. Tal fato não mimetiza plenamente a atual abordagem dos pacientes no que tange a reanimação volêmica e futuros estudos são necessários para promover alcançar os pressupostos citados por Bouillon e cols⁽⁶¹⁾. O uso de um modelo animal que tem instalação de coagulopatia mais precoce sem a necessidade de grandes infusões de volume parece mais adequado para a avaliação desse cenário. No presente estudo optou-se pelo uso do RL, preconizado em diretrizes em detrimento da solução salina a 0,9%, guardada para os casos em que há TCE associado. Diversos trabalhos sugerem que o uso de quantidades de solução cristaloide maiores do que 5000ml nas primeiras 24 horas, ou até mesmo menores, está associado com piores resultados (coagulopatia mais frequente, tempo de ventilação mecânica e mortalidade)^(25,72,73). Em analogia direta, os animais submetidos ao experimento foram submetidos a protocolo de reanimação volêmica com valores superiores aos citados na literatura citada, o que se apresenta como limitação nos diversos modelos na literatura e no modelo selecionado para o presente estudo.

5.3 A avaliação da coagulopatia

A disponibilidade da tromboelastometria como ferramenta para decisão terapêutica no trauma grave com CTA ainda é pequena, e apesar das suas potenciais vantagens, seu custo ainda é alto, inviabilizando seu uso em grande escala em países de baixa e média renda. Em países mais pobres, onde a maior parte do impacto da doença trauma reside, sua disponibilidade é provavelmente baixa mas não há estudos nas bases de dados consultadas com informações nacionais. Estudos sobre custos dos testes e posterior análise custo-benefício não estão disponíveis no Brasil ou países de semelhante índice de desenvolvimento ou renda. Em estudo prévio em pós-operatório em cirurgias cardíacas, verificou-se redução dos custos totais com o uso do ROTEM®, relacionado a redução do uso de hemocomponentes e hemoderivados⁽⁷⁴⁾. Ainda é frequente o uso de testes diagnósticos como o TP e o TTPA ou o tratamento empírico da coagulopatia. No presente estudo, ambos RL e PTX não apresentaram resultados significativamente relevantes nos testes de coagulação padrão e na análise do ROTEM®. Uma das possíveis razões está relacionada ao tipo de animal escolhido. Enquanto em não-primatas há um início mais precoce da coagulopatia, o mesmo não pode ser dito de outros mamíferos. Na análise do ROTEM®, os valores normais de humanos e suínos são semelhantes e um valor do ângulo alfa menor do que 65°, por exemplo, está geralmente presente quando a coagulopatia está instalada⁽⁷⁵⁾. Seu valor reflete a taxa de geração de fibrina. No presente estudo, houve alteração dos valores do ângulo alfa após o a fase de

reanimação, com a hipotermia e o uso de cristaloides. Entretanto valores menores do que 65° não foram encontrados em nenhum grupo ou tempo estudado. Os testes apresentados no presente trabalho, CT (que mede o tempo até o início da formação do coágulo), CFT (que avalia a velocidade da formação do coágulo entre 2 e 20mm), MCF (que avalia a força máxima do coágulo, sua estabilidade), ML (que avalia a lise máxima do coágulo, e desta forma, a fibrinólise) e o A10 (que representa a firmeza do coágulo após 10 minutos do CT), mostram alterações com significância estatística na fase pós-reanimação volêmica em todos os testes. A relevância clínica das alterações percebidas não foram entretanto notadas. Velik-Salchner et al ⁽⁷⁶⁾ publicaram um estudo com comparação da coagulabilidade entre humanos e porcos, e uma possível hipercoagulabilidade nos porcos pode ser uma explicação para os achados do presente estudo ⁽⁷⁷⁾.

5.4 Fibrinogênio

Uma estratégia de ressuscitação envolvendo a administração de PTX foi utilizada e foram encontrados dados que sugerem neste estudo potenciais benefícios em relação aos níveis de fibrinogênio. O papel do fibrinogênio é crucial na coagulação, uma vez que sua conversão em fibrina é uma parte importante de um coágulo sanguíneo estável. Se os níveis de fibrinogênio são insuficientes em situações de sangramento, os coágulos de fibrina podem não ser firmes o suficiente. Baixos níveis plasmáticos são freqüentemente observados antes da diluição por infusão em casos graves de trauma ⁽⁸²⁾. Os

baixos níveis de fibrinogênio podem ser explicados devido à perda de sangue e ao aumento do consumo mas são conhecidos outros fatores que afetam o metabolismo do fibrinogênio em pacientes traumatizados com sangramento maciço. A hipotermia reduz a síntese de fibrinogênio enquanto a acidemia após hipoperfusão leva ao aumento da fibrinólise ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾. Além da redução da disponibilidade de fibrinogênio, há indícios de que a utilização de fibrinogênio é reduzida em pacientes com coagulopatia por trauma. Esse achado está associado a níveis aumentados de trombomodulina solúvel e aumento da ativação da proteína C ^(86,87). Em resumo, os mecanismos envolvidos na diminuição do fibrinogênio plasmático são os seguintes: consumo induzido por ativação da coagulação, hiperfibrinólise e fibrinogenólise (ativação induzida por choque e coagulação) e dilucional (infusão e transfusão). Os níveis plasmáticos de fibrinogênio diminuídos na chegada ao pronto-socorro são um preditor independente da necessidade maciça de transfusão e morte em pacientes com trauma grave ^(82,85) e seu limiar de concentração em pacientes traumatizados gravemente ainda não está estabelecido. Hayakawa et al. ⁽⁸²⁾ sugerem 200mg/dL como preditor de sangramento maciço e morte. Nesse estudo mostrou-se que RL apenas versus RL em associação com PTX apresentou níveis mais baixos de fibrinogênio e RL não apresentou melhora no nível sérico de fibrinogênio, enquanto PTX teve um fibrinogênio final de 375mg/dL (enquanto os níveis de RL no tempo final foram 141,2mg/dL, $p<0,01$). No presente estudo não foi avaliado a via FIBTEM, que inativa a função plaquetária através do uso da citocalasina D ⁽⁸⁸⁾ e avalia o coágulo

resultante no que diz respeito a formação e polimerização da fibrina e essa via se apresenta como uma possibilidade em futuros estudos.

5.5 Considerações finais

O potencial papel da pentoxifilina nos níveis de fibrinogênio pode ser estudado com a utilização de modelo animal, eventualmente de primatas não-humanos, com modalidade de reanimação volêmica incluindo o uso de hemocomponentes e maior período de observação, potencializando a análise da coagulopatia e da inflamação. O curto período de observação no presente estudo não permitiu uma análise adequada do impacto do tratamento e um experimento mais longo pode nos mostrar resultados mais significativos. A análise de sobrevivência após o tratamento é um resultado importante que deve ser estudado se experimentos mais longos forem desenhados.

No futuro, estudos com a pentoxifilina como adjuvante da terapia farmacológica no trauma devem ser realizados, no cenário pré-clínico ou clínico.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A pentoxifilina tem efeito benéfico sobre os níveis de fibrinogênio quando associada à reanimação volêmica em modelo apresentado, reprodutível e exequível, que promoveu acidose e a alteração da coagulação e permitiu a indução da hipotermia.

7 ANEXOS

7. ANEXOS

A **CEUA** do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26/06/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **073/14** intitulado: **“Efeito da Pentoxifilina na reanimação, coagulopatia e inflamação em modelo animal de múltiplos traumas”** que utilizará **38** animais da espécie **Suíno**, apresentado pelo Departamento de Cirurgia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Edna Frasson de Souza Montero

Pesquisador (a) Executante: Rodrigo Vaz Ferreira

CEUA-FMUSP, 26 de Junho de 2014.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. http://www.who.int/violence_injury_prevention/medianews2016/18_09/en/ WHOGHEceSDe.
2. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/matriz.htm> D-IeDB-B-MdSceSDe.
3. Sakran JV, Greer SE, Werlin E, McCunn M. Care of the injured worldwide: trauma still the neglected disease of modern society. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2012;20:64.
4. Kauvar DS, Lefering R, Wade CE. Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *J Trauma.* 2006;60(6 Suppl):S3-11.
5. Eddy VA, Morris JA Jr., Cullinane DC. Hypothermia, coagulopathy, and acidosis. *Surg Clin North Am.* 2000;80(3):845-54.
6. Feliciano DV, Mattox KL, Jordan GL, Jr. Intra-abdominal packing for control of hepatic hemorrhage: a reappraisal. *J Trauma.* 1981;21(4):285-90.
7. Curry N, Davis PW. What's new in resuscitation strategies for the patient with multiple trauma? *Injury.* 2012;43(7):1021-8.
8. Thorsen K, Ringdal KG, Strand K, Soreide E, Hagemo J, Soreide K. Clinical and cellular effects of hypothermia, acidosis and coagulopathy in major injury. *Br J Surg.* 2011;98(7):894-907.

9. ATLS Subcommittee; 'American College of Surgeons' Committee on Trauma; International ATLS working group. Advanced trauma life support (ATLS®): the ninth edition. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013;74(5):1363-6.
10. Rotondo MF, Schwab CW, McGonigal MD, Phillips GR, 3rd, Fruchterman TM, Kauder DR, et al. 'Damage control': an approach for improved survival in exsanguinating penetrating abdominal injury. *J Trauma.* 1993;35(3):375-82; discussion 82-3.
11. Davenport R, Khan S. Management of major trauma haemorrhage: treatment priorities and controversies. *Br J Haematol.* 2011;155(5):537-48.
12. Stahel PF, Smith WR, Moore EE. Current trends in resuscitation strategy for the multiply injured patient. *Injury.* 2009;40 Suppl 4:S27-35.
13. Lord JM, Midwinter MJ, Chen YF, Belli A, Brohi K, Kovacs EJ, et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet (London, England).* 2014;384(9952):1455-65.
14. Pierce A, Pittet JF. Inflammatory response to trauma: implications for coagulation and resuscitation. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2014;27(2):246-52.
15. Gando S, Tede I, Kubota M. Posttrauma coagulation and fibrinolysis. *Crit Care Med.* 1992;20(5):594-600.
16. Nast-Kolb D, Waydhas C, Gippner-Steppert C, Schneider I, Trupka A, Ruchholtz S, et al. Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. *J Trauma.* 1997;42(3):446-54; discussion 54-5.
17. Esmon CT. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends Immunol.* 2004;25(10):536-42.

18. Frith D, Goslings JC, Gaarder C, Maegele M, Cohen MJ, Allard S, Johansson PI, Stanworth S, Thiemermann C, Brohi K. Definition and drivers of acute traumatic coagulopathy: clinical and experimental investigations. *J Thromb Haemost.* 2010;8(9):1919-25.
19. Ordog GJ, Wasserberger J, Balasubramaniam S. Coagulation abnormalities in traumatic shock. *Ann Emerg Med.* 1985;14(7):650-5.
20. Hewson JR, Neame PB, Kumar N, Ayrton A, Gregor P, Davis C, Shragge BW. Coagulopathy related to dilution and hypotension during massive transfusion. *Crit Care Med.* 1985;13(5):387-91.
21. Cohen MJ. Acute traumatic coagulopathy: clinical characterization and mechanistic investigation. *Thromb Res.* 2014;133 Suppl 1:S25-7.
22. Davenport RA, Brohi K. Cause of trauma-induced coagulopathy. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2016;29(2):212-9.
23. Brohi K, Singh J, Heron M, Coats T. Acute traumatic coagulopathy. *J Trauma.* 2003;54(6):1127-30.
24. MacLeod JB, Lynn M, McKenney MG, Cohn SM, Murtha M. Early coagulopathy predicts mortality in trauma. *J Trauma.* 2003;55(1):39-44.
25. Maegele M, Lefering R, Yucel N, Tjardes T, Rixen D, Paffrath T, Simanski C, Neugebauer E, Bouillon B; AG Polytrauma of the German Trauma Society (DGU). Early coagulopathy in multiple injury: an analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients. *Injury.* 2007;38(3):298-304.
26. Schochl H, Grassetto A, Schlimp CJ. Management of hemorrhage in trauma. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2013;27(4 Suppl):S35-43.

-
27. Schochl H, Schlimp CJ. Trauma bleeding management: the concept of goal-directed primary care. *Anesth Analg*. 2014;119(5):1064-73.
 28. Schochl H, Voelckel W, Schlimp CJ. Management of traumatic haemorrhage--the European perspective. *Anaesthesia*. 2015;70 Suppl 1:102-7, e35-7.
 29. Choi SB, Choi JY, Park JS, Kim DW. ATLS Hypovolemic Shock Classification by prediction of blood loss in rats using regression models. *Shock (Augusta, Ga)*. 2016;46(1):92-8.
 30. Kanani AN, Hartshorn S. NICE clinical guideline NG39: Major trauma: assessment and initial management. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2017;102(1):20-3..
 31. Rossaint R, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Crit Care*. 2016;20:100.
 32. Driessen A, Frohlich M, Schafer N, Mutschler M, Defosse JM, Brockamp T, et al. Prehospital volume resuscitation--Did evidence defeat the crystalloid dogma? An analysis of the TraumaRegister DGU(R) 2002-2012. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2016;24:42.
 33. Duke MD, Guidry C, Guice J, Stuke L, Marr AB, Hunt JP, et al. Restrictive fluid resuscitation in combination with damage control resuscitation: time for adaptation. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;73(3):674-8.
 34. Hussmann B, Heuer M, Lefering R, Touma A, Schoeneberg C, Keitel J, et al. Prehospital volume therapy as an independent risk factor after trauma. *BioMed Res Int*. 2015;2015:354367.

-
35. Spahn DR, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, et al. Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline. *Crit Care*. 2013;17(2):R76.
 36. Hussmann B, Lefering R, Waydhas C, Touma A, Kauther MD, Ruchholtz S, et al. Does increased prehospital replacement volume lead to a poor clinical course and an increased mortality? A matched-pair analysis of 1896 patients of the Trauma Registry of the German Society for Trauma Surgery who were managed by an emergency doctor at the accident site. *Injury*. 2013;44(5):611-7.
 37. Moore FA. The use of lactated ringer's in shock resuscitation: the good, the bad and the ugly. *J Trauma*. 2011;70(5 Suppl):S15-6.
 38. Savage SA, Fitzpatrick CM, Kashyap VS, Clouse WD, Kerby JD. Endothelial dysfunction after lactated Ringer's solution resuscitation for hemorrhagic shock. *J Trauma*. 2005;59(2):284-90.
 39. Stensballe J, Ostrowski SR, Johansson PI. Haemostatic resuscitation in trauma: the next generation. *Curr Opin Crit Care*. 2016;22(6):591-7.
 40. Scalea TM. Hemostatic resuscitation for acute traumatic coagulopathy. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2011;19:2.
 41. Smith IM, James RH, Dretzke J, Midwinter MJ. Prehospital blood product resuscitation for trauma: a systematic review. *Shock (Augusta, Ga)*. 2016;46(1):3-16.
 42. Shakur H, Roberts I, Bautista R, Caballero J, Coats T, Dewan Y, et al. Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9734):23-32.

43. Deree J, Martins J, de Campos T, Putnam JG, Loomis WH, Wolf P, et al. Pentoxifylline attenuates lung injury and modulates transcription factor activity in hemorrhagic shock. *J Surg Res.* 2007;143(1):99-108.
44. Coimbra R, Melbostad H, Loomis W, Porcides RD, Wolf P, Tobar M, et al. LPS-induced acute lung injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on proinflammatory mediators, metalloproteinases, NF-kappaB, and ICAM-1 expression. *J Trauma.* 2006;60(1):115-25.
45. Coimbra R, Porcides RD, Melbostad H, Loomis W, Tobar M, Hoyt DB, Wolf P. Nonspecific phosphodiesterase inhibition attenuates liver injury in acute endotoxemia. *Surg Infect (Laechmt).* 2005;6(1):73-85.
46. Sener G, Akgun U, Satiroglu H, Topaloglu U, Keyer-Uysal M. The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. *Fundam Clin Pharmacol.* 2001;15(1):19-22.
47. Costantini TW, Deree J, Martins JO, Putnam JG, Campos T, Coimbra R. A novel fluid resuscitation strategy modulates pulmonary transcription factor activation in a murine model of hemorrhagic shock. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(6):621-8.
48. Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. Insights into the regulation of TNF- α production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics.* 2008;63(3):321-8.
49. Coimbra R, Melbostad H, Loomis W, Tobar M, Hoyt DB. Phosphodiesterase inhibition decreases nuclear factor-kappaB activation and shifts the cytokine response toward anti-inflammatory activity in acute endotoxemia. *J Trauma.* 2005;59(3):575-82.

-
50. Kreth S, Ledderose C, Luchting B, Weis F, Thiel M. Immunomodulatory properties of pentoxifylline are mediated via adenosine-dependent pathways. *Shock* (Augusta, Ga). 2010;34(1):10-6.
51. Kocdor MA, Kocdor H, Gulay Z, Gokce O. The effects of pentoxifylline on bacterial translocation after intestinal obstruction. *Shock* (Augusta, Ga). 2002;18(2):148-51.
52. Shukla VK, Ojha AK, Pandey M, Pandey BL. Pentoxifylline in perforated peritonitis: results of a randomised, placebo controlled trial. *Eur J Surg*. 2001;167(8):622-4.
53. Staubach KH, Schroder J, Stuber F, Gehrke K, Traumann E, Zabel P. Effect of pentoxifylline in severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arch Surg* (Chicago, Ill : 1960). 1998;133(1):94-100.
54. Michetti C, Coimbra R, Hoyt DB, Loomis W, Junger W, Wolf P. Pentoxifylline reduces acute lung injury in chronic endotoxemia. *J Surg Res*. 2003;115(1):92-9.
55. Coimbra R, Melbostad H, Hoyt DB. Effects of phosphodiesterase inhibition on the inflammatory response after shock: role of pentoxifylline. *J Trauma*. 2004;56(2):442-9.
56. Festing S, Wilkinson R. The ethics of animal research. *Talking Point on the use of animals in scientific research. EMBO Reports*. 2007;8(6):526-30.
57. Cho SD, Holcomb JB, Tieu BH, Englehart MS, Morris MS, Karahan ZA, et al. Reproducibility of an animal model simulating complex combat-related injury in a multiple-institution format. *Shock* (Augusta, Ga). 2009;31(1):87-96.

-
58. Bush JA, Jensen WN, Cartwright GE, Wintrobe MM. Blood volume studies in normal and anemic swine. *Am J Physiol.* 1955;181(1):9-14.
59. Tsuei BJ, Kearney PA. Hypothermia in the trauma patient. *Injury.* 2004;35(1):7-15.
60. Siegel S, Castellan Jr NJ. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. 2^a ed. New York: McGraw-Hill; 1988.
61. Bouillon B, Brohi K, Hess JR, Holcomb JB, Parr MJ, Parr MJ, Hoyt DB. Educational initiative on critical bleeding in trauma: Chicago, July 11-13, 2008. *J Trauma.* 2010;68(1):225-30.
62. Parr MJ, Bouillon B, Brohi K, Dutton RP, Hauser CJ, Hess JR et al. Traumatic coagulopathy: where are the good experimental models? *J Trauma.* 2008;65(4):766-71.
63. Tsukamoto T, Pape HC. Animal models for trauma research: what are the options? *Shock.* 2009;31(1):3-10.
64. Rezende-Neto JB, Rizoli SB, Andrade MV, Lisboa TA, Cunha-Melo JR. Rabbit model of uncontrolled hemorrhagic shock and hypotensive resuscitation. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(12):1153-9.
65. Sheppard FR, Macko A, Fryer DM, Ozuna KM, Brown AK, Crossland RF, et al. Development of a nonhuman primate (rhesus macaque) model of uncontrolled traumatic liver hemorrhage. *Shock.* 2015;44:114–22.
66. Sheppard FR, Macko AR, Glaser JJ, Vernon PJ, Burdette AJ, Paredes RM, et al. Nonhuman Primate (Rhesus Macaque) Models of Severe Pressure-Targeted Hemorrhagic and Polytraumatic Hemorrhagic Shock. *Shock.* 2018;49(2):174–86

-
67. Alam HB, Bice LM, Butt MU, Cho SD, Dubick MA, Duggan M, et al. Testing of blood products in a polytrauma model: results of a multi-institutional randomized preclinical trial. *J Trauma*. 2009;67(4):856-64.
68. Majde JA. Animal models for hemorrhage and resuscitation research. *J Trauma*. 2003;54(5 Suppl):S100-5.
69. Guerado E, Medina A, Mata MI, Galvan JM, Bertrand ML. Protocols for massive blood transfusion: when and why, and potential complications. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2016 Jun;42(3):283–95.
70. Cantle PM, Cotton BA. Prediction of Massive Transfusion in Trauma. *Crit Care Clin*. 2017 Jan;33(1):71–84.
71. Lim G, Harper-Kirksey K, Parekh R, Manini AF. Efficacy of a massive transfusion protocol for hemorrhagic trauma resuscitation. *Am J Emerg Med*. 2018 Jul;36(7):1178–81.
72. Chatrath V, Khetarpal R, Ahuja J. Fluid management in patients with trauma: Restrictive versus liberal approach. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2015/09/04. 2015;31(3):308–16.
73. Kasotakis G, Sideris A, Yang Y, de Moya M, Alam H, King DR, et al. Aggressive early crystalloid resuscitation adversely affects outcomes in adult blunt trauma patients: an analysis of the Glue Grant database. *J Trauma Acute Care Surg*. 2013 May;74(5):1212–5.
74. Spalding GJ, Hartrumpf M, Sierig T, Oesberg N, Kirschke CG, Albes JM. Cost reduction of perioperative coagulation management in cardiac surgery: value of “bedside” thrombelastography (ROTEM). *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007 Jun;31(6):1052–7.

-
75. Schochl H, Voelckel W, Grassetto A, Schlimp CJ. Practical application of point-of-care coagulation testing to guide treatment decisions in trauma. *J Trauma Acute Care Surg*. 2013 Jun;74(6):1587–98.
76. Velik-Salchner C, Schnürer C, Fries D, Müssigang PR, Moser PL, Streif W, et al. Normal values for thrombelastography (ROTEM®) and selected coagulation parameters in porcine blood. *Thromb Res [Internet]*. 117(5):597–602.
77. Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A, Quehenberger P, Jilma B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost*. 2008 Sep;100(3):397–404
78. Larsson MA, Forsman P, Hedenqvist P, Ostlund A, Hultman J, Wikman A, et al. Extracorporeal membrane oxygenation improves coagulopathy in an experimental traumatic hemorrhagic model. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2017;43(5):701-709.
79. Mapstone J, Roberts I, Evans P. Fluid resuscitation strategies: a systematic review of animal trials. *J Trauma*. 2003;55(3):571-89.
80. Sondeen JL, Dubick MA, Holcomb JB, Wade CE. Uncontrolled hemorrhage differs from volume- or pressure-matched controlled hemorrhage in swine. *Shock*. 2007;28(4):426-33.
81. Horst K, Hildebrand F, Pfeifer R, Hübenthal S, Almahmoud K, Sassen M, Steinfeldt T, Wulf H, Ruchholtz S, Pape HC, Eschbach D. Impact of haemorrhagic shock intensity on the dynamic of alarmins release in porcine poly-trauma animal model. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2016;42(1):67-75.
82. Hayakawa M. Dynamics of fibrinogen in acute phases of trauma. *J Intensive Care [Internet]*. 2017;5(1):4–9.

-
83. Martini WZ. Fibrinogen metabolic responses to trauma. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2009/01/16. 2009;17:2
84. Martini WZ, Chinkes DL, Pusateri AE, Holcomb JB, Yu Y-M, Zhang X-J, et al. Acute changes in fibrinogen metabolism and coagulation after hemorrhage in pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Nov;289(5):E930-4.
85. Hagemo J, Jørgensen J. Changes in fibrinogen availability and utilization in an animal model of traumatic coagulopathy. ... *J trauma*, ... [Internet]. 2013 [cited 2013 Nov 20];1–8.
86. Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Schultz MJ, Levi M, Mackersie RC, et al. Acute coagulopathy of trauma: hypoperfusion induces systemic anticoagulation and hyperfibrinolysis. *J Trauma*. 2008 May;64(5):1211–7; discussion 1217.
87. Cohen MJ, Call M, Nelson M, Calfee CS, Esmon CT, Brohi K, et al. Critical role of activated protein C in early coagulopathy and later organ failure, infection and death in trauma patients. *Ann Surg*. 2012 Feb;255(2):379–85.
88. Hagemo JS, Christiaans SC, Stanworth SJ, Brohi K, Johansson PI, Goslings JC, et al. Detection of acute traumatic coagulopathy and massive transfusion requirements by means of rotational thromboelastometry: An international prospective validation study. *Crit Care*. 2015;19(1):1–7.