Leticia Urbano Cardoso de Castro

**Avaliação dos efeitos da ressuscitação volêmica com Ringer
lactato ou terlipressina na função renal em modelo
experimental de choque hemorrágico em ratos**

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia da Conceição
Andrade

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Castro, Leticia Urbano Cardoso de
Avaliação dos efeitos da ressuscitação volêmica
com Ringer lactato ou terlipressina na função renal
em modelo experimental de choque hemorrágico em
ratos / Leticia Urbano Cardoso de Castro. -- São
Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Lúcia da Conceição Andrade.

Descritores: 1.Choque hemorrágico 2.Lesão renal
aguda 3.Vasoconstritores 4.Terlipressina 5.Lactato
de Ringer 6.Receptores de vasopressinas 7.Inflamação

USP/FM/DBD-118/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais

Elisabeth e Manoel

e ao meu marido Anderson.

AGRADECIMENTOS

Sabe aquele meme da velhinha do Titanic que está escrito “Já faz 84 anos...”? Então, essa é a sensação de terminar meu doutorado!

Mas no meio da pandemia de COVID, posso me sentir vitoriosa de terminá-lo, não é?

Nesses últimos anos a ciência nunca foi tão colocada em xeque e tão visada pela sociedade. O cientista nunca foi tão valorizado e ao mesmo tempo desacreditado como agora. Mas não podemos perder a esperança de tempo melhores e ter orgulho do nosso trabalho.

Nessa caminhada várias pessoas fizeram e fazem parte dessa conquista tão importante.

O LIM 12 é um laboratório que acolhe todo mundo que chega, e assim eu me senti no dia que comecei a fazer pesquisa aqui.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Lúcia Andrade por tudo! Ela é realmente uma orientadora, que ajuda, se envolve em todas decisões, está sempre disposta a discutir tudo e todos os aspectos dos trabalhos. Ela passa tanto conhecimento para todo mundo que é muito inspirador! Obrigada!

E quem me trouxe pro LIM 12 foi minha amiga-irmã Dra. Talita Rojas. Ela me conhece desde quando eu estava na barriga da minha mãe e graças a nossa amizade tenho uma mãe postiça que sinto muitas saudades e um sobrinho postiço lindo e futuro astronauta/neurocirurgião, o Theo, que me deu o melhor apelido do mundo: Xálelê!

Todos fazem parte da minha história e tem um pedacinho de participação no meu trabalho (direta ou indiretamente) e na minha vida. Mais que colegas de trabalho são amigos que fiz para uma vida toda e agradeço muito por tê-los conhecido. Mirela, Eloá, Igor, Denise, Antônio, Kellen, Dra. Camila Eleutério, Dra. Daniela Ferreira, Nivaldo, Nicole e Heloisa.

Agradeço também a toda ajuda que tive com a parte de imunohistoquímica da Cléo (LIM 29) e da Ivone (LIM 16). Aprendi muito e minha próxima meta é estabelecer de vez esse protocolo em nosso laboratório.

Agradeço aos meus pais, Elisabeth e Manoel. Está sendo uma época muito difícil, de distanciamento social e passamos por tempos muito ruins. A única coisa que importa é eu estar com eles (mesmo que vendo com menos frequência), e agradecer a vida deles, saudáveis. Não tenho palavras pra expressar meu agradecimento em tudo que já fizeram por mim, por todo o apoio e dedicação em minha criação.

Ao meu marido, Anderson, com quem construo uma vida há 15 anos, que me conheceu com 17 anos e me viu amadurecer como pessoa e como profissional, que me apoiou e me apoia tanto em tudo que eu faço. Tenho muito orgulho de nosso relacionamento, de tudo que construímos juntos, nossa família com nosso filho de 4 patas, nossas pequenas conquistas.

Agradeço a minha família toda também, que sempre se preocupam comigo. Meus irmãos Heitor e Victor, minha madrastra Eliane, todos os meus tios e tias, primos e primas. Não poderia deixar de falar da minha sobrinha e afilhada Paolla. Ela resolveu chegar no mesmo dia do meu aniversário, e foi uma chegada pra trazer leveza para as nossas vidas. Espero poder ser um exemplo de como ser uma mulher forte, estudiosa, perseverante e que vai atrás de seus objetivos.

Não posso deixar de agradecer ao LIM 08, laboratório que me acolheu e onde fiz todo o modelo experimental nos animais. Ao Dr. Luiz Marcelo Malbouisson pela oportunidade de dar continuidade a pesquisa com o tema; a Dra. Denise Otsuki por toda ajuda e muito aprendizado que ela me proporcionou; á Dra. Débora Ramos e ao Gilberto, tão fundamentais no funcionamento do laboratório e dos experimentos, muito obrigada por toda a ajuda!

Agradeço também aos meus amigos de fora do laboratório que fazem parte também dessa jornada.

Agradeço aos ratos e a todos os animais que são utilizados em pesquisa, essenciais na busca pelo conhecimento. Sem eles não teríamos nada do avanço na ciência que temos agora.

Agradeço também a CAPES, CNPQ e FAPESP pelo auxílio financeiro na pesquisa do laboratório.

Blackbird singing in the dead of night
Take these broken wings and learn to fly
All your life
You were only waiting for this moment to arise

Blackbird singing in the dead of night
Take these sunken eyes and learn to see
All your life
You were only waiting for this moment to be free

The Beatles – Black bird

SUMÁRIO

Resumo	9
Abstract	11
Introdução	12
Hipótese	21
Objetivos	22
Materiais e métodos	23
Resultados	34
Discussão	74
Referências bibliográficas	78

RESUMO

Castro LUC. *Avaliação dos efeitos da ressuscitação volêmica com Ringer lactato ou terlipressina na função renal em modelo experimental de choque hemorrágico em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

O choque hemorrágico (CH) é uma das principais causas de morte em pacientes que sofrem algum tipo de trauma. O principal tratamento para esse tipo de acometimento é a administração de solução cristaloide de Ringer lactato (RL). Apesar dos efeitos benéficos hemodinâmicos do RL, como o restabelecimento da pressão arterial média (PAM), existem efeitos colaterais importantes, como o edema e consequentemente lesão de órgãos. Por este motivo, novas estratégias de tratamento pré-hospitalar que visam a sobrevivência desses pacientes estão sendo estudadas. A Terlipressina (TLP) é uma delas. Seu grande efeito vasoconstritor pode ser promissor para o controle do sangramento ao mesmo tempo que restabelece a hemodinâmica e homeostasia. A TLP também teria um efeito anti-inflamatório. Em nosso projeto utilizamos ratos Wistar e realizamos um modelo experimental de CH de 60 minutos com pressão controlada entre 30-40 mmHg. Após o choque, foi feita a administração de solução de RL associada ou não à TLP, e após 15 minutos foi feita a reinfusão do sangue retirado. Os animais foram eutanasiados 24 horas após o CH, onde foi retirado, sangue, urina e os rins. Houve melhora da sobrevivência com o tratamento com TLP. Também observamos uma significativa melhora da função glomerular e tubular avaliadas pelo clearance de creatinina, N-GAL, fração de excreção de sódio (FENa), e expressão de aquaporina 2 (AQP2). Na histologia, observamos uma significativa diminuição de lesão tubular. Os animais tratados com TLP tiveram uma PAM mais elevada em relação aos outros grupos. Observamos também que os animais tratados com TLP apresentavam menor infiltração de macrófagos, IL-18 e menor expressão de NF- κ B, com aumento significativo de V1a e AT-1. Em conclusão, a administração de TLP pode ser uma terapia viável na IRA induzida pelo CH. A TLP portanto, pode atenuar a IRA modulando a resposta inflamatória via receptor V1a.

Descritores: Choque hemorrágico; Lesão renal aguda; Vasoconstritores; Terlipressina; Lactato de Ringer; Receptores de vasopressinas; Inflamação.

ABSTRACT

Castro LUC. *Evaluation of the effects of volume resuscitation with lactated Ringer or terlipressin on renal function in an experimental model of hemorrhagic shock in rats* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Hemorrhagic shock (HS) is a major cause of death in patients who suffer from trauma. The main treatment is the administration of lactated Ringer's crystalloid solution (LR). Despite the beneficial hemodynamic effects of LR, such as the restoration of mean arterial pressure (MAP), there are important side effects, such as edema and consequently organ damage. For this reason, new pre-hospital treatment strategies are required. Terlipressin (TLP) is one of them. Its great vasoconstrictor effect can be promising for the control of bleeding while restoring hemodynamics and homeostasis. TLP would also have an anti-inflammatory effect. In our project, we used Wistar rats and performed a 60-minute HS experimental model with controlled pressure between 30-40 mmHg. After the shock, the LR solution was administered with or without TLP, and after 15 minutes, the blood removed was reinfused. The animals were euthanized 24 hours after HS, where blood, urine and kidneys were removed. There was an improvement in survival with treatment with TLP. We also observed a significant improvement in glomerular and tubular function assessed by the clearance of creatinine, N-GAL, fraction excretion of sodium (FENa), and expression of aquaporin 2 (AQP2). In histology, we observed a significant decrease in tubular lesion. The animals treated with TLP had a higher MAP than the other groups. We also observed that the animals treated with TLP had lesser infiltration of macrophages, IL-18 and lesser expression of NF-kB, with a significant increase in V1a and AT-1 expression. In conclusion, the administration of TLP may be a viable therapy in HS-induced AKI. TLP can therefore attenuate AKI by modulating the inflammatory response via the V1a receptor.

Descriptors: Shock, hemorrhagic; Acute kidney injury; Vasoconstrictor agents; Terlipressin; Ringer's lactate; Receptors, vasopressin; Inflammation.

INTRODUÇÃO

O trauma e o choque hemorrágico

O trauma é um conjunto de perturbações causadas por um agente súbito físico e é uma das principais causas de morte no mundo inteiro, com cerca de 5,8 milhões casos ao ano, perdendo apenas para doenças oncológicas e cardiovasculares. No Brasil, é a segunda maior causa de morte. Um estudo feito pela Santa Casa de São Paulo demonstrou que cerca de 40% desses pacientes são jovens e vítimas de acidentes de carro ^{1,2,3}.

O choque hemorrágico (CH) e suas complicações correspondem a 40% dos óbitos em pacientes que sofreram algum tipo de trauma ^{3,4}.

O CH é caracterizado pela grande perda sanguínea, comprometendo o funcionamento normal dos órgãos, e assim podendo levar a morte ⁵.

As principais causas de hemorragia são sangramento gastrointestinal, ruptura de vasos, ruptura de aorta abdominal, coagulopatias como o sangramento espontâneo, entre outros ⁶. A severidade de um sangramento varia de acordo com 4 classes, conforme quadro abaixo (tabela 1):

Classificação da hemorragia				
Parâmetros	I	II	III	IV
Perda de sangue (ml)	<750	750-1500	1500-2000	>2000
Perda de sangue (%)	<15%	15-30%	30-40%	>40%
Pulsação	<100	>100	>120	>140
Pressão sanguínea	Normal	Diminuído	Diminuído	Diminuído
Taxa respiratória	14-20	20-30	30-40	>35
Volume urinário	>30	20-30	5-15	Insignificante
Sintomas: sistema nervoso central	Normal	Ansioso	Confuso	Letárgico

Tabela 1 – Tabela com a classificação da hemorragia ⁶.

Sabe-se que o CH causa inúmeros efeitos no organismo e pode ser visto como uma isquemia/reperfusão global, podendo afetar vários sistemas ⁷. A perda de grande quantidade de sangue acarreta em alterações no sistema inflamatório, no sistema imune, leva a aumento do estresse oxidativo, e desencadeiam alterações de isquemia/reperfusão em diversos órgãos como rim e cérebro ^{8,9,10,11}.

A hipovolemia leva a severa queda de transporte de oxigênio para as células e coagulopatias, e se esse déficit de oxigênio não for corrigido em tempo, pode levar há uma ativação do processo inflamatório no organismo ^{12,13}.

Devido ao débito reduzido de oxigênio, o acúmulo de radicais inorgânicos e ácido láctico aumenta. Além disso, o mecanismo que leva a diminuição do ATP e alteração da homeostase celular, acarreta em morte celular, seguida de necrose através da ruptura de membrana e apoptose ¹².

A perda de sangue em excesso leva há uma série de processos homeostáticos para a preservação de órgãos vitais, como cérebro, coração e rins. O processo de hipovolemia e vasoconstrição leva a hipoperfusão e danos a órgãos como rins, intestino e fígado e assim levando os pacientes sobreviventes a uma insuficiência de múltiplos órgãos ¹². Por isso, é importante

uma precoce avaliação física e dos sinais vitais do paciente na hora do resgate, o reconhecimento do nível da gravidade e controle da hemorragia, além de realização de exames laboratoriais ^{12,14}.

CH e injúria renal aguda

Sabemos que a Injúria Renal Aguda (IRA) é uma das mais importantes e severas complicações após uma grande perda de sangue e seus efeitos nos rins podem ser permanente e até mesmo fatais.

Vários fatores estão envolvidos na piora do quadro dos que sofreram uma isquemia e o prognóstico é muito ruim nesses pacientes hospitalizados que desenvolvem IRA, aumentando o tempo de internação e a mortalidade.

A isquemia causa uma grande resposta inflamatória renal. O organismo é capaz de lidar com uma redução do fluxo sanguíneo renal, porém quando essa redução é muito grande e, sem intervenção, pode ocorrer uma disfunção da perfusão e manutenção da hipóxia ¹⁵.

A IRA pode causar disfunções em células endoteliais. Elas são importantes em várias funções, como regulação do fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular, modulação da inflamação, coagulação e na tonicidade vascular. Com a IRA, essas funções são comprometidas, causando edema, congestão vascular, aumento da permeabilidade e adesão de células inflamatórias ¹⁶.

A redução da perfusão renal na isquemia leva a uma vasoconstrição renal e com isso, a volemia total não pode ser corrigida, mesmo que o fluxo de sangue renal tenha sido normalizado. Há alteração da autoregulação renal, levando a vasoconstrição com predomínio da resposta vasoconstritora. Isto se deve, principalmente, a um aumento dos agentes vasoconstritores como endotelina, ativação do sistema nervoso simpático e diminuição dos agentes vasodilatadores como óxido nítrico, e prostaglandinas. Foi observado na IRA

níveis reduzidos de eNOS e com isso, ocorre uma perda de fatores antitrombóticos do endotélio levando a aumento dos fenômenos trombóticos microvasculares ^{16,17}.

Um estudo demonstrou que em 90 minutos de CH existe um aumento na expressão renal de TNF α e de IL-6, demonstrando assim uma resposta pró-inflamatória ¹⁸.

Quando ocorre uma isquemia/reperfusão renal há um aumento no infiltrado de macrófagos na fase precoce da IRA. A infiltração de macrófagos que ocorre após a reperfusão, pode contribuir para a injúria renal aumentando a cascata inflamatória através da secreção de citocinas inflamatórias e indução da morte celular por apoptose. A inibição da infiltração de macrófagos leva a melhora da IRA no modelo de isquemia/reperfusão ¹⁵.

O epitélio tubular participa na resposta pró-inflamatória renal, ativando, por exemplo TNF α , IL-6 e 8, MCP-1, TGF- β entre outras. Além da resposta pró-inflamatória, existe também a anti-inflamatória expressa pelos Toll-like receptors (TLR), receptor complementar e moléculas co-estimuladoras que fazem parte da regulação da ativação de células T ¹⁹.

As TLRs são importantes sinalizadoras que fazem parte da resposta imune inata do organismo e durante a IRA a sua expressão está aumentada. Quando a via de sinalização das TLR é ativada, uma cascata de resposta biológica ocorre, levando a ativação do Fator de Transcrição Nuclear (NF- κ B). Este ativado sinaliza o aumento da expressão de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias ²⁰.

As citocinas também tem importância na IRA principalmente as pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF α . Estudos demonstraram que sua inibição atenua a IRA. Sua produção está diretamente ligada a isquemia/reperfusão e a resposta de transcrição induzida pela hipóxia tecidual ¹⁹.

A IRA é uma das principais e mais frequentes complicações consequentes da hipovolemia. Com a interrupção do fluxo sanguíneo para as

células, ocorre hipóxia tecidual, comprometendo a função normal e prejudicando os processos de regeneração celular ²¹.

Um estudo demonstrou que em 90 minutos de CH existe um aumento na expressão renal de TNF α e de IL-6, demonstrando assim uma resposta pró-inflamatória ¹⁸.

A isquemia/reperfusão pode levar a IRA, ocorrendo comprometimento no ritmo de filtração glomerular e na reabsorção tubular. Há importante comprometimento da função tubular devido a lesão de transportadores iônicos e de água. Foi demonstrado que em animais submetidos a isquemia e reperfusão renal de 45 minutos, ocorreu importante diminuição da expressão das proteínas Aquaporina 2 (AQP2) e sódio potássio 2 cloros (NKCC2), levando, portanto, a alterações funcionais como a reabsorção de sódio e água e a capacidade de concentração urinária ²².

Gong *et al* demonstraram as alterações glomerulares e tubulares em um modelo experimental de CH. O protocolo foi feito com pressão controlada de 40mmHg por uma hora, e mesmo com a reinfusão de sangue, ocorreu um aumento da creatinina plasmática e uma diminuição do clearance de creatinina. Também foi observada uma diminuição dos canais de água AQP2 e AQP3 ²³.

Tratamento no CH

O principal tratamento pré-hospitalar em pacientes que sofreram uma grande perda sanguínea é a reposição volêmica ²⁴.

A responsabilidade no manejo, gestão e protocolos no resgate de vítimas de hemorragia em cena é uma das grandes dificuldades em hospitais no mundo. A média de tempo entre o início de uma hemorragia e a morte é de 2 horas. Portanto, a logística para um resgate precoce desse paciente tem que ser rápida e eficaz. Esse cuidado logo após o incidente da hemorragia, tem impacto crucial no salvamento desse paciente ^{25,26}.

Os cristaloides são a principal alternativa usada pelos paramédicos em hemorragias, e o Ringer lactato (RL) é a solução mais utilizada ^{24,27}.

Atualmente, a administração é feita utilizando-se três vezes o volume de sangue estimado perdido pelo paciente, para que seus efeitos não sejam apenas transitórios. A administração de RL em grande quantidade promove a expansão volêmica, reestabelecendo os parâmetros hemodinâmicos, prevenindo a morte do paciente até sua chegada ao hospital. Seus benefícios também se caracterizam pelo seu baixo custo, sua composição iônica ser semelhante à do plasma e por seus poucos efeitos colaterais diretos ^{24,27}. Entretanto existem divergências com relação aos benefícios da administração de RL na hipovolemia. Seu uso pode ser seguido por edema de órgãos, como por exemplo, o edema cerebral ¹⁰.

Mesmo com a ressuscitação adequada, existem consequências em pacientes com choque hipovolêmico, e a IRA é presente na grande maioria desses pacientes.

Assim como o CH tem consequências importantes nos rins como a hipóxia e aumento na produção de óxido nítrico, a ressuscitação também possui efeitos negativos como a indução de estresse oxidativo renal ¹⁷.

Uma das grandes dúvidas no socorro desses pacientes é qual tipo de volume administrar e qual a quantidade desse volume. Uma ressuscitação agressiva não é a mais indicada. Alguns trabalhos demonstraram os efeitos negativos da ressuscitação agressiva, como edema pulmonar, alterações de pH levando a acidose, coagulopatias devido a diluição, hipotermia devido ao grande volume administrado em temperatura não adequada, aumento na expressão de proteínas que indicam o aumento do edema cerebral, aumento de estresse oxidativo ^{3,10,28}.

Mayuer e colaboradores demonstraram em ratos que, após o CH e mesmo havendo reposição volêmica, importantes alterações renais se mantiveram, mesmo após vinte e um dias. Foi observado comprometimento da função renal, como diminuição do ritmo de filtração glomerular, elevação dos

níveis plasmáticos de Cistatina C, aumento do escore de lesão renal, e alterações causadas pela hipóxia tecidual como elevação da proteína HIF-1. Foram demonstrados também níveis elevados de fibrose de túbulos intersticiais, levando a hipótese de que a IRA, causada pelo CH, pode levar a doença renal crônica (DRC) ²⁹.

Novo tratamento no CH: terlipressina

Tendo em vista que a administração de RL pode levar a várias complicações como o edema de órgãos e, além disso, muitas vezes, não é suficiente para o restabelecimento hemodinâmico do paciente, fazem-se então necessárias novas alternativas. Atualmente, já se estuda associação de drogas ao uso da expansão volêmica ³⁰.

Sabe-se que após um grande sangramento o organismo se defende com uma resposta vasoconstritora, na tentativa de diminuir ao máximo, a perda de sangue ³¹. Por esse motivo, os vasoconstritores estão sendo usados como nova estratégia terapêutica no resgate precoce do CH.

A Terlipressina (TLP) é um fármaco sintético análogo da vasopressina e que possui um grande efeito vasoconstritor ³². Esse efeito é devido a sua afinidade com os receptores arginina vasopressina 1 (V1), e essa afinidade pode ser benéfica para os rins, aumentando o fluxo sanguíneo renal, a taxa de filtração glomerular e melhorando o fluxo sanguíneo medular ³³. Além de possuir um efeito vasoconstrictor maior, seu efeito vasoativo também é mais longo, se comparado a vasopressina. A vasopressina permanece na circulação por seis minutos e a TLP por seis horas ³⁴. A TLP é inativa em sua forma natural, quando ativada em sua forma biológica, lisina vasopressina, através de clivagem enzimática de resíduos de glicil, sua meia vida é prolongada, em comparação com a vasopressina e seus outros análogos ³⁵.

A administração de TLP já é fortemente estabelecida no tratamento de síndrome hepato-renal. Seus efeitos benéficos provavelmente são devidos a

sua ação de vasoconstrição arteriolar na área esplâncnica, e com isso promove um aumento da pressão sanguínea, redistribuição do fluxo sanguíneo e, portanto, melhorando o fluxo de órgãos ³⁵.

O interesse pela administração de TLP no tratamento pré-hospitalar de CH vem crescendo e novos trabalhos surgem.

A TLP possui um forte potencial para o tratamento pré-hospitalar do CH, pois desvia o fluxo sanguíneo da circulação esplâncnica em direção aos órgãos nobres, como coração, cérebro e pulmões, resultando em diminuição significativa do sangramento ^{36,37,38}.

Sabemos que um paciente em hemorragia, para uma redução da mortalidade é necessário um controle do sangramento e restabelecimento da pressão até a chegada em uma unidade de saúde. Em estudo, Bayram e colaboradores observaram em modelo não controlado de CH com remoção de parte do fígado, uma sobrevida maior do grupo que recebeu TLP em bolus. Além da maior sobrevida, observaram estabilidade na PAM e maior controle do sangramento ³⁹.

Um estudo publicado em 2014 comparou os efeitos da administração de RL, vasopressina e TLP em um modelo experimental de CH com amputação de cauda do animal. Foi observado que a administração de vasopressina e TLP foram capazes de restabelecer a PAM, porém no grupo tratado com TLP, esse restabelecimento foi mais longo e, portanto, eficaz. Analisando interleucinas pró e anti-inflamatórias, o grupo TLP também teve resultados satisfatórios, em comparação com os grupos tratados com RL e com vasopressina ³².

Sabe-se que a TLP possui efeitos benéficos no cérebro. Em trabalho publicado recentemente, demonstramos os efeitos hemodinâmicos e cerebrais da administração de RL ou TLP em modelo experimental pressão controlada de CH em porcos. Foi possível observar que os dois tratamentos, RL ou TLP, foram capazes de restabelecer os parâmetros hemodinâmicos ao longo de 120 minutos após os tratamentos. Entretanto, no grupo tratado com RL, houve uma diminuição da pressão de perfusão cerebral e um aumento da pressão

intracraniana, o que não foi observado no grupo tratado com TLP. Corroborando com esses dados, no grupo RL foi observado um aumento da AQP4 e NKCC1, confirmando, portanto, o edema cerebral causado pela administração de RL. Também foi observado um aumento do estresse oxidativo e da apoptose cerebral. Todos esses parâmetros foram reestabelecidos com a administração de TLP, demonstrando assim, um possível efeito protetor de sua administração ¹⁰.

Neste mesmo trabalho, analisamos os efeitos da administração de RL ou TLP sobre a função renal. Observamos que os dois tratamentos foram capazes de restabelecer a creatinina plasmática a níveis próximos ao do grupo Sham. Observando o clearance de creatinina, houve uma melhora logo após a administração de RL. Entretanto, nos tempos mais tardios, a TLP foi mais eficaz. Resultados semelhantes, também foram observados na diurese. Na análise de escore de lesão renal, é notável a existência de proteção renal com a administração dos dois tratamentos. Entretanto, o tratamento com TLP protegeu também a função tubular, normalizando a expressão proteica dos transportadores AQP2 e NKCC2. Além de diminuir a apoptose renal com a administração de TLP ⁴⁰.

A administração de TLP demonstra uma proteção vasoconstritora para o controle do sangramento e uma redistribuição de sangue para órgãos principais. A vasopressina é produzida em resposta ao baixo fluxo sanguíneo e sua estimulação, causada pelo receptor V1a aumenta a resistência vascular e assim, a redistribuição para órgãos vitais, como cérebro, coração e rins ⁴¹.

Levando em consideração as evidências de que, a TLP seja uma possível estratégia terapêutica para o tratamento pré-hospitalar no CH, vemos necessidade de novos estudos para entendermos os efeitos a médio prazo desse medicamento.

HIPÓTESE

Nossa hipótese é de que a associação da TLP com um tratamento menos agressivo de RL, isto é, em menor quantidade, seja uma alternativa para um desfecho pré-hospitalar mais favorável e com menos sequelas em pacientes que sofreram uma grande perda sanguínea. Para isso, criamos um modelo, em ratos, de choque hemorrágico tratado com RL, em diversas doses, associado ou não a Terlipressina.

OBJETIVOS

Avaliar a associação de terlipressina a uma menor quantidade de infusão de Ringer Lactato sobre a função renal e tubular, 24 horas após a indução do choque hemorrágico em ratos.

Objetivos secundários:

Avaliar:

1. Se há impacto na mortalidade
2. A resposta hemodinâmica frente ao uso de Ringer Lactato associado ou não à terlipressina
3. Se havendo proteção da função renal, quais seriam os mecanismos envolvidos

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 17.02.16 com número de protocolo 008/16.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso entre 200-400 gramas, submetidos ao seguinte protocolo experimental:

O experimento se iniciou com o procedimento anestésico, onde o animal foi intubado e feita a ventilação, juntamente com a administração de isoflurano (1,0%, inalatório) para manter o animal anestesiado ao longo do experimento. A artéria femoral foi canulada para a medição de pressão arterial média (PAM) e para a retirada de sangue. As medidas de PAM foram apresentadas em milímetros de mercúrio (mmHg). A veia femoral foi canulada para a administração do tratamento e devolução do sangue. Todos os catéteres foram mantidos desobstruídos por meio de uma solução heparinizada (5 U/mL de heparina).

Após uma breve estabilização do animal, o protocolo de CH teve início com a retirada de sangue em seringas de 1ml com citrato (0,07ml) para se alcançar a PAM de 30-40 mmHg, limitando-se à retirada de até 60% da volemia do animal. Este processo levou em torno de 20 minutos. A PAM então, foi mantida nesses valores por mais 40 minutos, por meio de reposição ou retirada de alíquotas, totalizando assim 60 minutos desde o início do sangramento.

Após isso, foi feita a administração dos tratamentos, em aproximadamente 20 minutos. Os animais, então, ficaram por 15 minutos em observação sem nenhum tipo de intervenção. A infusão de sangue ocorreu ao final dos 15 minutos de observação em todos os grupos submetidos ao CH e teve duração de 20 minutos.

Após o término da cirurgia, foi feita a sutura de pele no local da incisão dos animais e logo em seguida, foi feita a administração de xilocaína (2mg, subcutânea) para analgesia. Os animais foram colocados em gaiolas comuns com colchão de aquecimento por aproximadamente 6 horas para recuperação. Após o período de recuperação, no mesmo dia, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e retirados no dia seguinte. O processo completo do experimento encontra-se na figura 1.

Figura 1 – Delineamento do processo experimental.

GRUPOS

Para o andamento do estudo, os animais foram divididos em 4 grupos, sendo um grupo controle e 3 grupos que foram submetidos ao choque hemorrágico com tratamentos variados.

São eles:

- Grupo Controle N=6 – Os animais não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento.

- Grupo Ringer Lactato 3X (RL3X) N=10 – Foi realizado o protocolo de CH com administração de RL em quantidade 3 vezes superior ao volume de sangue retirado. A administração de RL foi feita em 20 minutos e o animal foi observado por mais 15 minutos após essa administração. Após isso, o sangue foi reinfundido nos animais em aproximadamente 20 minutos.

- Grupo Ringer lactato 2X + terlipressina (RL2X+TLP) N=8 – Foi realizado o protocolo de CH com administração de TLP (Ferring Pharmaceuticals, Switzerland) na dose de 10ug/100g associado à RL em quantidade de 2 vezes o volume de sangue retirado. A administração de RL 2X+TLP foi feita em 20 minutos e o animal foi observado por mais 15 minutos após essa administração. Após isso, o sangue foi reinfundido nos animais em aproximadamente 20 minutos.

- Grupo Ringer lactato 1X + terlipressina (RL1X+TLP) N=8 – Foi realizado o protocolo de CH com administração de TLP (Ferring Pharmaceuticals, Switzerland) na dose de 10ug/100g associado à RL em quantidade de 1 vez o volume de sangue retirado. A administração de RL 1X+TLP foi feita em 20

minutos e o animal foi observado por mais 15 minutos após essa administração. Após isso, o sangue foi reinfundido nos animais em aproximadamente 20 minutos.

GAIOLA METABÓLICA

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por aproximadamente 19 horas. Antes e após o período de permanência na gaiola, os animais foram pesados. A ingesta hídrica e o volume urinário foram medidos após as horas de permanência do animal na gaiola.

Para a eutanásia, os animais foram anestesiados com Tribromoetanol (2,2,2-Tribromoethanol 97% - Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) solução de 2,5%, calculando-se para cada 100g de peso do animal são 1ml da solução diluída em soro fisiológico aquecido. Após canulação da artéria renal, a perfusão de órgãos foi feita em bomba de infusão (Minipuls 3, Gilson) com solução de PBS (NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4), a uma velocidade de 8,4 ml/min. Sangue e os órgãos rins, pulmão, cérebro e coração foram retirados e armazenados para análises. As Alíquotas dos órgãos para imuno-histoquímica foram submersas em formalina tamponada 10% por 24 horas, e após esse período, armazenadas em álcool 70% até o momento de emblocamento. Os tecidos que foram utilizados para a técnica de Western blott foram imediatamente armazenados em criotubos e emergidas em nitrogênio líquido e após armazenadas no -80°C.

ANÁLISES DE SANGUE E URINA

Foram realizadas mensurações de sódio, potássio e creatinina para a determinação de seus níveis em sangue e urina. As amostras de sangue arterial e urina foram coletadas após a gaiola metabólica. As seringas estavam heparinizadas. Todas as amostras foram centrifugadas a 4.4 rpm por 10 minutos para separação do sangue e possíveis debris na urina. O sódio e o potássio foram dosados pelo aparelho EasyLyte Na/K Analyzer (Medica,

Bedford, Massachusetts, USA). A creatinina foi dosada utilizando o kit da Labtest Diagnóstica S/A, ref. 35 (Lagoa Santa, MG, Brasil). A osmolalidade foi dosada através do osmômetro modelo K-7400S (Knauer, Berlin, Germany,). A dosagem de N-GAL urinário foi obtida através do kit Rat NGAL Elisa, ref. 36 (BioPorto Diagnostics, Hellerup, Denmark) e seguimos as orientações do fabricante para a obtenção dos resultados.

ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RENAIIS

WESTERN BLOTT

Os tecidos de medula renal congelados em -80°C foram homogenizadas em uma solução de K-Hepes (200mM Mannitol, 80mM Hepes, 41mM KOH; pH 7.5) contendo inibidores de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). Todas as amostras foram colocadas em gelo e o homogenato foi centrifugado a 4.000g por 30 minutos a 4°C para remoção das células e resíduos celulares. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80 °C para posterior dosagem da concentração de proteínas, que foi realizada pelo método de Pierce BCA Protein Assay kit ref. 23225 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Após a dosagem da concentração, as amostras de proteína foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida. A transferência das proteínas foram feitas para membrana de PVDF (Amersham Hybond-P, GE Healthcare, UK). Após a transferência para as membranas, as mesmas foram bloqueadas com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T por 1 hora e incubados com anticorpos específicos diluídos em TBS-T. A marcação foi feita através da peroxidase (HRP) - conjugated secondary antibody. A normatização foi feita com uma nova hibridização das membranas com o anticorpo para Actina. Os anticorpos utilizados foram:

- Aquaporina 2 (AQP2) – Diluição para tecido de medula renal 1:500 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA), anticorpo secundário anti-goat 1:10.000 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) e β -Actina 1:100.000 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA).

- Receptor de Vasopressina 1a (V1a) - Diluição para tecido de medula renal 1:500 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA), anticorpo secundário anti-goat 1:10.000 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) e β -Actina 1:100.000 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA).

- NF-kb - Diluição para tecido de medula renal 1:500 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA), anticorpo secundário anti-rabbit 1:2.000 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) e β -Actina 1:100.000 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA).

As membranas foram submetidas a técnica de quimioluminescência Amersham ECL Western Blotting Detection (GE Healthcare, UK), a foto documentação foi feita utilizando o equipamento Alliance 4.2 (Uvitec, Cambridge, UK) e as bandas obtidas foram analisadas por densitometria pelo programa Scion Image for Windows (IBM PC) e normalizadas pela análise da densitometria da actina ⁴².

MEDIDAS DE ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo foi avaliado determinando os níveis no tecido renal de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da glutathione (GSH), um marcador da peroxidação lipídica, através do ensaio do ácido tiobarbitúrico. O ácido tiobarbitúrico reage com lipídios oxidados, gerando malondialdeído.

Uma alíquota de 0,2 ml de solução proteica extraído de córtex renal (o método de extração é o mesmo utilizado na extração de proteínas para

Western Blott) foi diluída em água destilada. Após, ácido tricloroacético (ATC) 17,5% e ácido tiobarbitúrico, pH 2, foram adicionados e levados a uma temperatura de 80°C por 20 minutos e logo após colocadas em gelo. Após foi adicionado ácido tricloroacético (ATC) 70% e incubados por 20 minutos. Foi feita uma centrifugação de 15 minutos a 2000rpm e a densidade ótica do sobrenadante foi lida a 534 nm contra um reagente “blank” em espectrofotômetro. Os níveis teciduais de TBARS e GSH foram expressos como nmol/mg/prot⁴³.

ANÁLISE DE INTERLEUCINAS

As medidas de citocinas em tecido renal foram feitas utilizando o sistema multiplex/luminex de detecção (MILLIPLEX MAP Kit – Multiplex Assays Usind Luminex, Alemanha) assim como o painel (Rat Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel) para analisar as citocinas IL-6, IL-10 e IL-18.

Para a dosagem das citocinas, as placas contendo 96 poços tiveram seus filtros lavados com Bioplex Wash Buffer, e logo, foram adicionadas beads conjugadas com os anticorpos anti-citocinas e lavados com o Bioplex Wash Buffer.

As amostras foram adicionadas segundo as diretrizes do fabricante, e se mantiveram incubadas por 2 horas. Foi feita a lavagem das placas com buffer e os anticorpos biotinilados foram incubados por 1 hora. A detecção das citocinas foram reconhecidas por epítomos diferentes daqueles anticorpos conjugados com as beads. As placas foram lavadas com buffer e analisadas pelo Bioplex Suspension Array System/Luminex (Bio-rad, Hercules, Califórnia, EUA) utilizando o software Bio-Plex Manager, versão 4.0 (Bio-rad, Hercules, Califórnia, EUA).

ANÁLISE HISTOLÓGICA

ESCORE DE LESÃO TECIDUAL RENAL

As amostras de tecidos renal foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 4 µm, que foram corados pela reação de hematoxilina-eosina (HE) para avaliação das lesões renais.

Para avaliação da extensão das áreas acometidas por lesões renais, 20 campos foram sequencialmente analisados. Cada campo foi avaliado através de escores que variavam de 0 a 4, de acordo com o seguinte critério: 0, menos do que 5% da área apresentando edema celular, degeneração vacuolar, necrose e descamação; I, entre 5-25% da área com comprometimento; II, 25-50% da área apresentando lesões renais; III, alterações envolvendo entre 50-75% do campo analisado; IV, mais do que 75% da área analisada apresentando lesões renais. Em seguida, um escore médio para cada animal foi calculado ⁴⁴.

ANÁLISE IMUNO HISTOLÓGICA – Receptor V1a, CD68, PCNA E AT-1

Os rins dos animais foram retirados e cortados transversalmente em um fragmento de aproximadamente meio centímetro e foram fixados em solução de formalina tamponada durante 24h horas. Após esse período, a solução de formalina foi substituída por álcool 70%.

Posteriormente, o tecido renal foi embebido em parafina, cortado em secções de 4 µm, desparafinizado e submetido à reação de imunohistoquímica. As ligações inespecíficas foram bloqueadas em solução de PBS contendo albumina bovina 1% e leite em pó desnatado a 2% por 30 minutos.

Os cortes renais foram incubados com os anticorpos primários diluídos em solução de PBS com mix de bloqueio de albumina bovina 1% + leite em pó desnatado 2%, para: receptor de V1a em diluição 1:200 (Cusabio Houston, Texas, EUA), detecção de macrófagos CD68 em diluição 1:200 (Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA), AT-1 em diluição 1:50 (RDI, San Jose, CA, EUA) e PCNA em diluição 1:50 (Dako), over night a 4°C. O produto da reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e a cor desenvolvida com DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Harris. A contagem foi realizada em 20 campos (0.087mm²) e examinados sob microscopia de luz em 40x.

ESTUDO DE APOPTOSE RENAL – TUNEL

A análise de apoptose em tecido renal foi medida através da técnica de TUNEL. As lâminas foram desparafinadas e utilizou-se o protocolo sugerido pelo fabricante. O kit utilizado foi Fragel DNA Fragmentation Detection kit, colorimetric - TDT enzyme - QIA33 (Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA). Foi feita a permeabilização das amostras com Proteinase K temperatura ambiente por 30 minutos. A reação de equilíbrio e inserção de nucleotídeos foi feita com a enzima TdT em câmara úmida por 90 minutos a 37°C. A finalização foi feita com tampão de parada e a coloração com DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e contraste com Methyl green. Foram avaliados 20 campos (0.087mm²) sob microscopia de luz em 40x de células TUNEL positivas, e assim determinando uma média para cada animal.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo programa GraphPad Prizma 5.01 por meio de provas paramétricas utilizando a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida do teste de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. O grau de significância estabelecido para análise estatística foi menor que 5% ($p < 0,05$). Os dados são apresentados com Média $\pm$ erro padrão.

RESULTADOS

MODELO EXPERIMENTAL

Todos os animais foram pesados antes do procedimento e os valores estão mostrados abaixo. Não observamos diferença estatística entre os grupos dos animais (tabela 2 e gráfico 1).

	Controle	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
Peso dos animais (g)	317,8±14,95	374,8±14,40	358,6±14,22	347,6±14,90

Tabela 2 – Tabela demonstrando os pesos dos animais antes da cirurgia de CH.

Gráfico 1– Gráfico demonstrando o peso dos animais antes da cirurgia.

Os animais dos grupos RL3x, RL2x+TLP e RL1x+TLP foram submetidos aos mesmos procedimentos e a quantidade de sangue retirada foi a mesma nos 3 grupos (tabela 3 e gráfico 2).

	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
Volume de sangue retirado (ml)	7,42±0,61	6,93±0,67	6,94±0,70

Tabela 3 – Tabela demonstrando os volumes de sangue retirado dos animais que foram submetidos ao CH.

Quantidade de sangue retirado dos animais

Gráfico 2– Gráfico demonstrando o volume de sangue retirado dos animais que foram submetidos ao CH.

Houve variação do peso dos animais 24h após o procedimento cirúrgico, mostrando que os animais do grupo RL3X ganharam peso (tabela 4 e gráfico 3).

	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
Peso pós gaiola	375,0±5,00*	275,0±5,00	310,1±14,66

Tabela 4 – Tabela demonstrando os pesos dos animais pós procedimento cirúrgico – 24h após indução e tratamento do choque. * p<0.05 vs. RL2x+TLP e RL1x+TLP.

Gráfico 3– Tabela demonstrando os pesos dos animais 24 após procedimento cirúrgico, isto é, 24h após indução e tratamento do choque hemorrágico. * p<0.05 vs. RL2x+TLP e RL1x+TLP.

Pudemos observar que o estado dos animais que receberam a associação de RL com a TLP foi de modo geral melhor, se recuperando mais rápido que os animais tratados apenas com RL.

Logo após a retirada da intubação, estes, tratados com TLP, começavam a se movimentar mais rapidamente, em comparação com o grupo RL3x, que demoravam mais para acordar e se movimentar. Todos os animais submetidos ao procedimento cirúrgico de CH receberam analgesia para o controle da dor.

MORTALIDADE

Não foram observados óbitos no grupo Controle, tendo um total de 6 animais. Observamos 3 óbitos no grupo RL3X em um total de 10 animais, observando diferença estatística significativa. No grupo RL1X+TLP, observamos 1 óbito em um total de 8 animais. Não houve óbitos no grupo RL2X+TLP, tendo um total de 8 animais (gráfico 4).

Gráfico 4- Demonstração em porcentagem da curva de sobrevida dos animais. * $p < 0.05$ vs RL2X+TLP; ** $p < 0.01$ vs Controle.

PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Observamos que o grupo Controle manteve a PAM estável em todo o experimento.

Nos grupos RL3X, RL2X+TLP e RL1X+TLP, observamos como era esperado, uma queda da PAM no momento do CH. O grupo RL3X foi capaz de restabelecer a PAM semelhante ao grupo Controle. Entretanto, os grupos tratados com a associação de TLP aumentaram significativamente a PAM logo após o tratamento quando comparados aos grupos controle e tratados apenas com RL. No final do experimento, após a re-infusão do sangue, os grupos RL2X+TLP e RL1X+TLP continuavam apresentando PAM maior em relação aos outros grupos (gráfico 5).

Gráfico 5 – Demonstração do acompanhamento dos animais e suas pressões. ^a $p < 0.001$ vs. Controle, ^b $p < 0.001$ vs. RL2X + TLP e RL1X + TLP, ^c $p < 0.01$ vs. Controle, ^d $p < 0.05$ vs. Controle.

BIOQUÍMICA

Volume urinário e ingesta hídrica

Após 24 horas em gaiolas metabólicas, o volume urinário e a ingesta hídrica dos animais foram medidas. Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (tabela 5 e gráficos 6 e 7).

Dados de Gaiola metabólica	Controle	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
Volume urinário (ml)	22,50±5,62	26,43±8,18	40,19±6,37	38,43±6,67
Ingesta hídrica (ml)	22,50±7,27	29,17±10,68	35,25±7,50	29,43±4,91

Tabela 5 – Dados de volume urinário e ingesta hídrica dos animais, colocados em gaiolas metabólicas por 24 horas, no mesmo dia da cirurgia de CH.

Gráfico 6 – Gráfico demonstrando o volume urinário dos animais após gaiola metabólica.

Gráfico 7 – Gráfico demonstrando a ingesta hídrica dos animais após gaiola metabólica.

Creatinina plasmática e Clearance de creatinina

Houve um aumento significativo no grupo RL1x+TLP em relação ao grupo Controle na medida de creatinina plasmática 24 horas após o CH (tabela 6 e gráfico 8).

	Controle	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
Creatinina plasmática	0,58±0,07	0,73±0,06	0,67±0,05	0,92±0,09*
(mg/dL)				

Tabela 6 – Tabela demonstrando os valores das médias de creatinina plasmática e erros padrões. * p<0.05 vs Controle.

Gráfico 8 – Gráfico demonstrando a creatinina plasmática 24 horas após o insulto de CH. * p<0.05 vs Controle.

Observamos que há uma diminuição significativa no clearance de creatinina no grupo RL3X em relação aos outros grupos (tabela 7 e gráfico 9).

	Controle	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
Clearance de creatinina	1,21±0,09	0,63±0,16 *	1,19±0,12	0,75±0,11
(ml/min)				

Tabela 7 – Tabela demonstrando o clearance de creatinina nos animais após gaiola metabólica. * p<0.05 vs. Controle e RL2x+TLP.

Gráfico 9 – Gráfico demonstrando o clearance de creatinina 24 horas após o insulto de CH. * p<0.05 vs. Controle e RL2+TLP.

Entretanto, quando fazemos uma comparação apenas com os grupos submetidos ao CH e tratados, observamos que o grupo RL2x+TLP tem um clearance de creatinina estatisticamente melhor em relação aos outros dois grupos (gráfico 10).

Gráfico 10 – Gráfico demonstrando o clearance de creatinina 24 horas após o insulto de CH, apenas nos grupos que foram submetidos ao CH e tratados. * $p < 0.05$ vs. RL3x e RL1x+TLP.

Sódio plasmático e fração de excreção de sódio

A natremia encontra-se normal 24 horas após CH em todos os grupos. No grupo R2X+TLP há uma tendência a hiponatremia, embora não significativa (Tabela 8 e gráfico 11).

Observamos um aumento significativo na fração de excreção de sódio nos animais do grupo RL3x em relação ao grupo controle (tabela 8 e gráfico 12).

	Controle	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
Sódio plasmático (mEq/L)	142,2±1,01	136,2±4,52	135,9±1,40	142,5±3,49
FE Sódio (%)	0,20±0,06	1,34±0,41*	0,83±0,20	0,69±0,25

Tabela 8 – Tabela demonstrando os valores de sódio plasmático e a fração de excreção (FE) de sódio nos animais após gaiola metabólica. * p<0.05 vs Controle.

Gráfico 11 – Gráfico demonstrando a concentração de sódio plasmático, 24 horas após CH.

Gráfico 12 – Gráfico demonstrando a fração de excreção de sódio. * $p < 0.05$ vs. Controle.

Potássio plasmático e fração de excreção de potássio

Não há diferença entre os grupos com relação ao potássio sérico e a caliurese (Tabela 9 e gráficos 13 e 14).

	Controle	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
Potássio plasmático (mEq/L)	3,75±0,25	4,38±0,45	4,17±0,25	4,30±0,12
FE Potássio (%)	34,98±10,88	42,27±9,73	32,15±4,52	45,81±5,6

Tabela 9 – Tabela demonstrando os valores na concentração de potássio plasmático e a fração de excreção de potássio.

Gráfico 13 – Gráfico demonstrando o potássio plasmático 24 horas após CH.

Gráfico 14 – Gráfico demonstrando a fração de excreção de potássio 24 horas após CH.

Ureia plasmática e fração de excreção de ureia

Observamos um aumento significativo na dosagem de ureia plasmática nos grupos submetidos ao CH e tratados. Na fração de excreção de ureia vemos um aumento significativo apenas no grupo RL3x em relação aos outros grupos (tabela 10 e gráficos 15 e 16).

	Controle	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
Ureia plasmática (mg/dL)	47,17±2,67	79,27±15,58 *	88,38±9,98 *	98,24±5,43 **
FE Ureia (%)	42,77±11,47	159,8±55,16 ++	52,67±10,64	65,30±13,16

Tabela 10 – Tabela demonstrando os valores na concentração de ureia plasmática e a fração de excreção de ureia. * p<0.05 vs. Controle e ** p<0.01 vs. Controle, ++ p<0.01 vs. Controle, RL2x+TLP e RL1x+TLP.

Gráfico 15 – Gráfico demonstrando os valores de ureia plasmática 24 horas após CH. * p<0.05 vs. Controle e ** p<0.01 vs. Controle.

Gráfico 16 – Gráfico demonstrando a fração de excreção de ureia. ++ $p < 0.01$ vs. Controle, RL2x+TLP e RL1x+TLP.

Osmolalidade plasmática e urinária

Não observamos diferença estatística com relação osmolalidade plasmática e urinária nos grupos estudados (tabela 11 e gráficos 17 e 18).

	Controle	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
Osmolalidade plasmática (mOsm)	299±6,28	278,2±10,19	276,6±4,9	282,4±1,99
Osmolalidade urinária(mOsm)	443,3±147,6	509,5±87,24	373,9±56,47	459,3±83,64

Tabela 11 - Gráfico demonstrando a osmolalidade plasmática e urinária dos animais após 24 horas de CH.

Gráfico 17 - Gráfico demonstrando a osmolalidade plasmática dos animais 24 horas após CH.

Gráfico 18 - Gráfico demonstrando a osmolalidade urinária dos animais 24 horas após CH.

N-GAL urinário

Observamos um aumento significativo de N-GAL urinário no grupo RL3x em relação a todos os outros grupos do experimento, 24 horas após o CH, demonstrando assim a lesão renal aguda (tabela 12 e gráfico 19).

	Controle	RL3X	RL2X+TLP	RL1X+TLP
N-GAL urinário (ng/uCR)	0,48±0,14	316,3±151,7 **	42,55±12,85	55,07±10,30

Tabela 12 – Tabela demonstrando os valores urinários do marcador N-GAL 24 horas após CH.

**p<0.01 vs. Controle, RL2x+TLP e RL1x+TLP.

Gráfico 19 - Gráfico demonstrando o N-GAL urinário dos animais 24 horas após CH. ** p<0.01 vs. Controle, RL2X+TLP e RL1X+TLP.

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RENAIS

AQP2 – Via Western blott

Observamos, como era o esperado, uma diminuição da expressão da AQP2 nos grupos que sofreram o choque, entretanto nos grupos tratados com TLP houve significativa diferença em relação ao grupo RL3x (gráfico 20 e figura 2).

Gráfico 20 – Gráfico demonstrando a distribuição em % do cotransportador de água AQP2 em tecido medular renal 24 horas após CH. *** $p < 0.001$ vs. Controle; ++ $p < 0.01$ vs. RL2x+TLP; +++ $p < 0.001$ vs. RL1x+TLP.

AQP 2 - medula

Figura 2– Imagem de gel de western blott demonstrando o resultado do gráfico acima do cotransportador de água AQP2 em medula renal.

NF-kB – Via Western blott

Houve aumento significativo na expressão do NF-kB nos grupos RL3x e RL1x+TLP em relação ao grupo Controle, e normalização desta expressão no grupo RL2x+TLP (gráfico 21 e figura 3).

Gráfico 21 – Gráfico demonstrando a distribuição em % de NF-kB em tecido medular renal 24 horas após CH. * p<0.05 vs. Controle, + p< 0.05 vs. RL3x e RL1x+TLP.

Figura 3- Imagem de gel de western blott demonstrando o resultado do gráfico acima do NF-kB em medula renal.

Extresse oxidativo

TBARS

Não observamos diferença estatística entre os grupos na dosagem de TBARS, entretanto observamos que o grupo RL2X+TLP apresenta os menores valores em relação aos grupos RL3X e RL1X+TLP (gráfico 22).

Figura 22 - Gráfico demonstrando a distribuição nos níveis de TBARS em proteína renal.

GSH

Também não observamos diferença estatística entre os grupos na dosagem de GSH (gráfico 23).

Figura 23 - Gráfico demonstrando a distribuição nos níveis de GSH em proteína renal.

Interleucinas inflamatórias

IL-6

Não observamos diferença estatística 24 horas após o CH, com relação a IL-6 (gráfico 24).

Gráfico 24 – Gráfico demonstrando os níveis de IL-6 em tecido renal nos animais após 24 horas de CH.

IL-10

Não observamos diferença estatística também na IL-10 entre os grupos de animais (gráfico 25).

Gráfico 25– Gráfico demonstrando os níveis de IL-10 em tecido renal nos animais após 24 horas de CH.

IL-18

Vemos um aumento significativo no grupo RL3x com relação aos outros grupos tratados com TLP (gráfico 26).

Gráfico 26– Gráfico demonstrando os níveis de IL-18 em tecido renal nos animais após 24 horas de CH. * $p < 0.05$ vs. RL2x+TLP e RL1x+TLP.

ESCORE DE LESÃO TUBULAR

Observamos no escore de lesão um aumento significativo nos grupos RL3x e RL1x+TLP em relação aos grupos Controle e RL2x+TLP. Há também diferença significativa entre os grupos RL3x e RL1x+TLP, mostrando que o tratamento reduziu em parte a lesão tubular neste grupo (gráfico 27 e figura 4).

Gráfico 27 –Gráfico mostrando os níveis de escore de lesão em tecido renal. *** $p < 0.001$ vs. Controle e RL2x+TLP; ** $p < 0.01$ vs. RL1x+TLP; ## $p < 0.01$ vs. Controle e RL2x+TLP.

Escore de lesão tubular

Figura 4 – Fotos em microscópio com foco de 100x demonstrando os níveis de escore de lesão tubular.

APOPTOSE RENAL – TÉCNICA DE TUNEL

A apoptose renal foi medida pelo método de TUNEL e não foi observado diferença estatística entre os grupos, 24 horas após o insulto de CH. Mesmo sem significância estatística, o grupo RL1X+TLP apresenta uma contagem maior de células positivas para apoptose. (gráfico 28 e figura 5).

Gráfico 28 – Gráfico demonstrando os níveis de apoptose renal, analisado pela técnica de TUNEL.

TUNEL

Figura 5 – Fotos em microscópio com foco de 40x demonstrando os níveis de apoptose renal feitas com kit de TUNEL.

IMUNO-HISTOQUÍMICA

CD68

Analizando os macrófagos em tecido cortical renal, observamos aumento significativo no grupo tratado com RL3x em relação ao grupo Controle. Nos grupos tratados com TLP houve uma tendência a uma menor infiltração de CD68 em relação ao grupo RL3x. (gráfico 29 e figura 6)

Gráfico 29 – Gráfico mostrando os níveis de macrófago em tecido renal, demonstrado pela detecção de CD68. * p < 0.05 vs. Controle.

CD68

Figura 6 – Fotos em microscópio com foco de 40x demonstrando os níveis de escore de lesão.

PCNA

Não observamos diferença estatística entre os grupos no marcador de proliferação celular PCNA, apesar da tendência ao aumento de todos os grupos em relação ao grupo Controle (gráfico 30 e figura 7).

Gráfico 30 – Gráfico mostrando a marcação de proliferação celular, demonstrado pela marcação de PCNA.

PCNA

Figura 7 – Figura com as fotos de lâminas em microscópio com foco em 40x com a marcação do anticorpo PCNA.

Receptor AT-1

Observamos um aumento na expressão do receptor AT-1 no grupo RL2x+TLP em relação aos grupos Controle, RL3x e RL1x+TLP (gráfico 31 e figura 8).

Gráfico 31 – Gráfico demonstrando a marcação do receptor de angiotensina, AT-1. * $p < 0.05$ vs. Controle, RL3x, e RL1x+TLP.

Receptor AT-1

Figura 8 – Figura com as fotos de lâminas em microscópio com foco em 40x com a marcação do anticorpo do receptor AT-1.

Receptor V1a – Via Western blott

A expressão do receptor V1a está reduzida no grupo RL3x e normalizada nos grupos tratados com TLP em relação ao grupo Controle (gráfico 32 e figura 9).

Gráfico 32– Gráfico demonstrando a distribuição em % do receptor V1-a em tecido medular renal 24 horas após CH. *** $p < 0.001$ vs. Controle, RL2x+TLP e RL1x+TLP.

Receptor V1-medula

Actina

Figura 9 - Imagem de gel de western blott demonstrando o resultado do gráfico acima do receptor V1-a em medula renal.

Receptor V1a – Via Imuno-histoquímica

Já na análise da expressão do receptor V1a por imunohistoquímica, observamos que a normalização da expressão ocorreu somente no grupo RL2x+TLP, e se mantém reduzida nos grupos RL3x e RL1x+TLP em relação ao grupo Controle (gráfico 33 e figura 10).

Gráfico 33 – Gráfico demonstrando a contagem do receptor V1a em córtex renal. * $p < 0.05$ vs RL2x+TLP; ** $p < 0.01$ vs. Controle.

Receptor V1-a

Figura 10 – Figura com as fotos de lâminas em microscópio com foco em 40x com a marcação do receptor V1a.

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, foi possível estabelecer que após 60 minutos de CH controlado, tanto a IRA quanto as lesões histológicas da necrose tubular aguda foram induzidas em ratos. Há na literatura muita dificuldade na padronização de modelo experimental animal que mimetize uma situação clínica semelhante ao CH, principalmente quando estudado 24 horas após a indução do CH ^{45,46}.

Além disso, demonstramos que o uso de TLP acompanhado de uma ressuscitação não agressiva de RL (2x a perda de sangue), levou à redução da mortalidade e a parcial proteção da resposta inflamatória renal. Houve diminuição da expressão de NF-κB e assim, conseqüentemente, atenuação do processo inflamatório. Interessante observar que a expressão do receptor V1a foi normalizada no grupo RL2x+TLP.

O CH induzido pelo trauma, é uma das principais causas de morte em jovem nas grandes cidades de países de baixa e média renda ^{47,48}. Durante o período pré hospitalar, a hemorragia contribui para um aumento na mortalidade de 33% a 56% dos casos, e é a causa de morte mais comum nas chegadas nos serviços de emergência ⁴⁹. Na cidade de São Paulo esta é uma importante causa de morte e IRA nos jovens ⁵⁰.

Até o momento, a administração agressiva de RL é amplamente utilizada na ressuscitação nos casos de choque hipovolêmico, incluindo CH ^{51,52}. A prática padrão na administração em casos de CH é o uso de cristalóides em alto volume. Entretanto, essa prática pode resultar em efeitos adversos como por exemplo, o edema intersticial em vários órgãos ⁵³, aumento no perfil de citocinas inflamatórias ⁵⁴ e aumento na pressão intracraniana ⁵⁵.

Lee e colaboradores demonstraram que a utilização de vasopressores está associado a um menor edema de fígado e um perfil de citocinas inflamatórias mais favorável ⁵⁴.

No nosso estudo, no grupo RL3x, os animais apresentaram peso corpóreo maior e volume urinário semelhante aos grupos tratados com TLP.

Esse aumento no peso dos animais pode estar relacionado com um aumento do edema corporal já que o volume urinário foi semelhante entre os grupos. A TLP associada a uma administração menos agressiva de RL, pode preservar os animais da elevação do edema causado pela administração de volume em grande quantidade.

Em um estudo anterior, o nosso grupo ¹⁰ demonstrou em um modelo de CH em porcos que a TLP foi efetiva na normalização da pressão de perfusão cerebral, diminuição do edema e de marcadores cerebrais de transporte de água.

Maybauer e colaboradores demonstraram que em modelo experimental de sepse em ovelhas, a administração de Selespressina (um agonista de V1a), foi capaz de reduzir o edema e o balanço hídrico positivo. Esta redução no acumulado de fluidos foi associada a uma diminuição da queda da concentração proteica no plasma e na pressão oncótica. Os autores puderam concluir que a ressuscitação com esse agonista do receptor V1a bloqueou o extravasamento vascular. A selespressina pode diminuir o aumento da permeabilidade vascular pulmonar. O aumento da permeabilidade vascular é um fator de pior prognóstico em pacientes com sepse ⁵⁶.

A Terlipressina, um agonista do receptor de vasopressina V1a, é inativo em sua forma nativa, porém é transformado em sua forma ativa lisina-vasopressina através da clivagem enzimática de resíduos de glicil por peptidases em tecidos ³⁵.

Pode ser administrado em bolus, e por este motivo, pode ser administrado em pacientes que requerem um tempo de transporte maior para um centro hospitalar. A TLP tem sido estudada como droga vasoativa no manejo da hipotensão arterial resistente às catecolaminas no choque séptico ⁵⁷, na insuficiência hepática ⁵⁸ e no sangramento agudo gastrointestinal ⁵⁹.

Os efeitos da TLP consistem na vasoconstrição de musculatura lisa e também vasoconstrição esplâncnica levando, portanto, a uma redistribuição do

fluxo sanguíneo para perfusão de órgãos nobres como fígado, rins e cérebro. Em modelos animais de CH, a TLP diminuiu a mortalidade ^{35,41}.

Demonstramos que há aumento na sobrevida com a administração de TLP. Esta melhora da sobrevida pode estar relacionada a uma maior proteção endotelial, a uma diminuição da inflamação ou mesmo pelo aumento da pressão arterial pós recuperação do choque. Todos estes mecanismos devem ser melhor estudados.

Além disso, nós demonstramos também que nos animais tratados com TLP houve proteção da função renal, medida pelo clearance de creatinina, N-GAL e pela expressão de transportadores tubulares renais de sódio e água. Nosso grupo já havia demonstrado anteriormente que, 120 minutos após CH induzido em suínos, a TLP protegeu a função renal dos animais ⁴⁰. Demonstramos agora, em modelo de ratos, que essa proteção renal se mantém até 24 horas após a indução do CH. O tratamento com TLP foi capaz de proteger a função e diminuir o dano tecidual histológico renal. Entretanto, essa proteção foi mais acentuada no grupo RL2x+TLP em comparação ao grupo RL1x+TLP. O clearance de creatinina e o escore de lesão tubular foram diferentes no grupo RL2x+TLP em comparação com o grupo RL1x+TLP. Especulamos que a administração de líquido ainda é obrigatória no CH.

Os efeitos na injúria renal por isquemia/reperfusão desencadeiam uma cascata inflamatória. Por isso, a supressão da resposta inflamatória é uma das respostas terapêuticas para a proteção do tecido renal ^{15,60}.

Isquemia/reperfusão induz a produção de citocinas pró-inflamatórias renais, como a IL-18 ²⁰ e mediadores inflamatórios, levando a uma ativação na sinalização da via NF-κB, que tem importante função na modulação da inflamação e imunidade. O tratamento com TLP foi capaz de restaurar a expressão de NF-κB, IL-18 e infiltração de CD68. Zhao e colaboradores estudaram a complexa cascata de sinalização ativada pelo agonista de V1 ([Phe ², Orn⁸]-oxitocina) em astrócitos. Investigando o impacto de um agonista de V1 na função imune de astrócitos e observando a regulação da produção de citocinas inflamatórias, eles demonstraram que o agonista de V1 suprimiu a

expressão de IL-1B e TNf-alpha tanto na expressão do mRNA quanto nos níveis de peptídeos secretados ⁶¹. Esse estudo indica que o agonista de V1 age como um modulador imune para reprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em astrócitos e sugere que esse agonista de V1 pode exercer um efeito anti-inflamatório in vivo.

A ativação do receptor V1a causada pela administração de TLP e seus efeitos anti-inflamatórios na IRA induzida pelo CH ainda precisa ser melhor estudado.

Já está bem estabelecido o papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona na manutenção da pressão sanguínea durante o CH ⁶². Nós demonstramos que a expressão do receptor de AT-1 está aumentada no grupo RL2x+TLP em relação aos grupos Controle, RL3x e RL1x+TLP. Esse achado pode refletir em uma resposta reguladora nas concentrações de angiotensina II intrarenal mesmo após 24h do CH.

Aoyagi e colaboradores demonstraram que a atividade de renina no plasma e os níveis de angiotensina II diminuíram em camundongos knockout para o receptor V1a, em comparação com os selvagens, em condições basais e com restrição na ingesta hídrica. Esses achados demonstram que nos animais knockout, o sistema renina angiotensina (SRA) estava suprimido ⁶³.

Já é de conhecimento científico que a ativação do receptor V1a estimula a atividade do SRA e também atua na liberação de aldosterona ⁶⁴.

Nosso estudo demonstrou que após 24 horas do CH, a TLP foi capaz de normalizar os níveis do receptor V1a e aumentar os níveis de AT-1.

O porquê do aumento da expressão de receptores AT-1 neste grupo de animais precisa ainda ser melhor estudado.

Em conclusão, a administração de TLP pode ser uma terapia viável na IRA induzida pelo CH. A TLP atenua a IRA modulando a resposta inflamatória via receptor V1a.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sociedade Brasileira de Atendimento Integrado ao Traumatizado, O que é Trauma? Disponível em: <http://www.sbait.org.br/trauma.php>> Acesso em 14 de abril de 2014.
2. Dias I. Clínica Médica, TDAH X Trauma. Disponível em: <http://tdah.com.br/paginas/gaetah/Boletim3.htm>> Acesso em 14 de abril de 2014.
3. Jacob M, Kumar P. The challenge in management of hemorrhagic shock in trauma. Med J Armed Forces India. 2014 Apr; 70(2):163-9.
4. Nandra KK, Collino M, Rogazzo M, Fantozzi R, Patel NS, Thiernemann C. Pharmacological preconditioning with erythropoietin attenuates the organ injury and dysfunction induced in a rat model of hemorrhagic shock. Dis Model Mech. 2013 May; 6(3):701-9.
5. Legrand M, Mik EG, Balestra GM, Lutter R, Pirracchio R, Payen D, et al. Fluid resuscitation does not improve renal oxygenation during hemorrhagic shock in rats. Anesthesiology. 2010;112(1):119-27.
6. Gutierrez G, Reines HD, Wulf-Gutierrez ME. Clinical review: hemorrhagic shock. CritCare. 2004; 8(5):373-81.
7. Douzinas EE, Andrianakis I, Livaditi O, Paneris P, Tasoulis M, Pelekanou A, Betrosian A, Giamarellos-Bourboulis EJ. The level of hypotension during hemorrhagic shock is a major determinant of the post-resuscitation

- systemic inflammatory response: an experimental study. *BMC Physiol.* 2008 Jul 18; 8:15.
8. Hostmann A, Jasse K, Schulze-Tanzil G, Robinson Y, Oberholzer A, Ertel W, Tschoeke SK. Biphasic onset of splenic apoptosis following hemorrhagic shock: critical implications for Bax, Bcl-2, and Mcl-1 proteins. *Crit Care.* 2008; 12(1): R8.
 9. Lee CC, Lee MT, Chang SS, Lee SH, Huang YC, Yo CH, Lee SH1, Chen SC. A Comparison of Vasopressin, Terlipressin and Lactated Ringers for Resuscitation of Uncontrolled Hemorrhagic Shock in an Animal Model. *PLoS One.* 2014 Apr 23; 9(4): e95821.
 10. Ida KK, Otsuki DA, Sasaki AT, Borges ES, Castro LU, Sanches TR, Shimizu MH, Andrade LC, Auler JO Jr, Dyson A, Smith KJ, Rocha FilhoJA, Malbouisson LM. Effects of terlipressin as early treatment for protection of brain in a model of haemorrhagic shock. *Crit Care.* 2015 Mar 13; 19:107.
 11. Powell RD, Swet JH, Kennedy KL, Huynh TT, Murphy MP, Mckillop IH, Evans SL. MitoQ modulates oxidative stress and decreases inflammation following hemorrhage. *J Trauma Acute Care Surg.* 2015 Mar; 78(3):573-9.
 12. Cannon JW. Hemorrhagic Shock. *N Engl J Med.* 2018 Jan 25; 378(4):370-379.
 13. Eguillor JFC, Ferrara G, Edul VSK, Buscetti MG, Canales HS, Lattanzio B, Gatti L, Gutierrez FJ, Dubin A. Effects of Systemic Hypothermia on

Microcirculation in Conditions of Hemodynamic Stability and in Hemorrhagic Shock. Shock. 2020 Jul 15.

14.Tokunaga K, Nakamura K, Inokuchi R, Hayase N, Terada R, Tomioka Y, Ikeda T, Kobayashi E, Okazaki H, Sakuma I, Doi K, Morimura N.Variation of Internal Jugular Vein as a Marker of Volume Change in Hemorrhagic Shock. Shock. 2020 Dec;54(6):717-722.

15.Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. J Mol Med (Berl) 2009 Sep;87(9):859-64.

16.Sharfuddin AA, et al. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. Nat Rev Nephrol. 2011 Apr;7(4):189-200.

17.Harrois A, et al. Acute kidney injury in trauma patients. Curr Opin Crit Care. 2017 Dec;23(6):447-456.

18.van Meurs M, et al. Hemorrhagic Shock-induced Endothelial Cell Activation in a Spontaneous Breathing and a Mechanical Ventilation Hemorrhagic shock Model Is Induced by a Proinflammatory Response and Not by Hypoxia. Anesthesiology. 2011 Sep;115(3):474-82.

19.Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. Clin Immunol. 2009 Jan;130(1):41-50.

20.Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. J Clin Invest. 2011 Nov;121(11):4210-21.

21. Santos OF, Durão JR MS, Neto MC, Draib AS, Boim MA, Schor N. Insuficiência Renal Aguda (Lesão Renal Aguda). In: Riella MC, editor. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólitos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. P.355-368.
22. Fernández-Llama P, Andrews P, Turner R, Saggi S, Dimari J, Kwon TH, Nielsen S, Safirstein R, Knepper MA. Decreased abundance of collecting duct aquaporins in post-ischemic renal failure in rats. J Am Soc Nephrol. 1999 Aug;10(8):1658-68.
23. Gong H, Wang W, Kwon TH, Jonassen T, Frøkiaer J, Nielsen S. Reduced renal expression of AQP2, p-AQP2 and AQP3 in haemorrhagic shock-induced acute renal failure. Nephrol Dial Transplant. 2003 Dec; 18(12):2551-9.
24. Fraga AO, Auler Jr JOC. Choque Hemorrágico: Fisiopatologia e Reposição Volêmica. Rev Bras Anesthesiol 1999; 49: 3: 213 – 224.
25. Dauer E, Goldberg A. What's New in Trauma Resuscitation? Adv Surg. 2019 Sep;53:221-233.
26. Jaures M, et al. Bleeding management after implementation of the Hemorrhage Code (Code H) at the Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil. Einstein (Sao Paulo). 2020; 18:eAO5032.
27. Auler Jr JOC, Fantoni DT - Reposição Volêmica nos Estados de Choque Hemorrágico e Séptico. Rev Bras Anesthesiol 1999; 49: 2: 126 – 138.
28. Cantle PM, Cotton BA. Balanced Resuscitation in Trauma Management. Surg Clin North Am. 2017 Oct;97(5):999-1014.

29. Mayeur N, Minville V, Jaafar A, Allard J, Al Saati T, Guilbeau-Frugier C, Fourcade O, Girolami JP, Schaak S, Tack I. Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med*. 2011 Sep;39(9):2131-8.
30. Lima R, Villela NR, Bouskela E. Microcirculatory effects of selective receptor blockade during hemorrhagic shock treatment with vasopressin experimental study in the dorsal chamber. *Shock*. 2012 Nov; 38(5): 493-8.
31. Cossu AP, Mura P, De Giudici LM, Puddu D, Pasin L, Evangelista M, Xanthos T, Musu M1, Finco G. Vasopressin in hemorrhagic shock: a systematic review and meta-analysis of randomized animal trials. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:421291.
32. Lee CC, Lee MT, Chang SS, Lee SH, Huang YC, Yo CH, Lee SH, Chen SC. A comparison of vasopressin, terlipressin, and lactated ringers for resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock in an animal model. *PLoS One*. 2014 Apr 23;9(4): e95821.
33. Ari E, Yilmaz Y, Kedrah AE, Alahdab Y, Cakalagaoglu F, Arikan H, et al. Protective effect of the vasopressin agonist terlipressin in a rat model of contrast-induced nephropathy. *Am J Nephrol*. 2011;33(3):269-76.
34. Felix VN. Terlipressin as a new therapeutic agent in septic shock. *Rev. bras. ter. intensiva* v.18 n.2 São Paulo abr./jun. 2006.
35. Narahara Y, Kanazawa H, Taki Y, Kimura Y, Atsukawa M, Katakura T, Kidokoro H, Harimoto H, Fukuda T, Matsushita Y, Nakatsuka K, Sakamoto C. Effects of terlipressin on systemic, hepatic and renal hemodynamics in patients with cirrhosis. *J GastroenterolHepatol*. 2009 Nov; 24(11):1791-7.

36. Tsuneyoshi I, Onomoto M, Yonetani A, Kanmura Y. Low-dose vasopressin infusion in patients with severe vasodilatory hypotension after prolonged hemorrhage during general anesthesia. *J Anesth.* 2005; 19(2):170-3.
37. Voelckel WG, Raedler C, Wenzel V, Lindner KH, Krismer AC, Schmittinger CA, et al. Arginine vasopressin, but not epinephrine, improves survival in uncontrolled hemorrhagic shock after liver trauma in pigs. *Crit Care Med.* 2003; 31(4):1160-5.
38. Voelckel WG, Convertino VA, Lurie KG, Karlbauer A, Schöchl H, Lindner KH, et al. Vasopressin for hemorrhagic shock management: revisiting the potential value in civilian and combat casualty care. *J Trauma.* 2010; 69. Suppl 1:S69-74.
39. Bayram B, Hocaoglu N, Atilla R, Kalkan S. Effects of terlipressin in a rat model of severe uncontrolled hemorrhage via liver injury. *Am J Emerg Med.* 2012 Sep;30(7):1176-82.
40. Castro LUC, Ida KK, Otsuki DA, Sanches TRC, Volpini RA, Borges ES, Malbouisson LM, Andrade LC. Vasopressin analog terlipressin attenuates kidney injury in hemorrhagic shock. *Trauma Surgery & Acute Care Open* 2016; 1:e000039.
41. Gil-Anton J, et al. Addition of terlipressin to initial volume resuscitation in a pediatric model of hemorrhagic shock improves hemodynamics and cerebral perfusion. *PLoS One.* 2020 Jul 2;15(7):e0235084.
42. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose

- and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
43. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-8.
44. Miyaji T, Kato A, Yasuda H, Fujigaki Y, Hishida. A Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Am SocNephrol* 12: 900-908.
45. Tsukamoto T., Pape H.C. Animal models for trauma research: what are the options? *Shock.* 2009 Jan;31(1):3-10.
46. Singh AP, et al. Animal models of acute renal failure *pharmacol. Rep.*, 64 (2012), pp. 31-44.
47. Bommakanti K, et al. Trauma registry implementation in low- and middle-income countries: challenges and opportunities. *J Surg Res.* 2018 Mar; 223:72-86.
48. Laytin AD, et al. Comparing traditional and novel injury scoring systems in a US level-I trauma center: an opportunity for improved injury surveillance in low- and middle-income countries. *J Surg Res.* 2017 Jul;215:60-66.
49. Sauaia A, et al. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. *J Trauma.* 1995 Feb; 38(2):185-93.
50. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação sobre Mortalidade. <http://tabnet.datasus.gov.br>> Acesso em 30 de abril de 2021.

51. Rohrig R, et al. Adverse effects of resuscitation with lactated ringer compared with ringer solution after severe hemorrhagic shock in rats. *Shock*, 38 (2012), pp. 137-145.
52. Phillips CR, Vinecore K, Hagg DS, Sawai RS, Differding JA, Watters JM, Schreiber MA. Resuscitation of hemorrhagic shock with normal saline vs. lactated Ringer's: effects on oxygenation, extravascular lung water and hemodynamics. *Crit Care* 13(2):R30, 2009.
53. Moon PF. Effects of isotonic crystalloid resuscitation on fluid compartments in hemorrhaged rats *Shock*. 1994;2:355–61.
54. Lee CC, et al. A comparison of vasopressin, terlipressin, and lactated ringers for resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock in an animal model. *PLoS One*. 2014;9:e95821.
55. Cavus E, et al. Cerebral effects of three resuscitation protocols in uncontrolled haemorrhagic shock: a randomised controlled experimental study. *Resuscitation*. 2009; 80:567–72.
56. Maybauer MO, et al. The selective vasopressin type 1a receptor agonist selepressin (FE 202158) blocks vascular leak in ovine severe sepsis. *Crit Care Med*. 2014 July; 42(7): e525–e533.
57. Morelli A, et al. Continuous terlipressin versus vasopressin infusion in septic shock (TERLIVAP): a randomized, controlled pilot study. *Crit Care*. 2009;13:R130.
58. Eefsen M, et al. Comparison of terlipressin and noradrenalin on cerebral perfusion, intracranial pressure and cerebral extracellular concentrations of lactate and pyruvate in patients with acute liver failure in need of inotropic support. *J Hepatol*. 2007;47:381–6.

59. Levacher S, et al. Early administration of terlipressin plus glyceryl trinitrate to control active upper gastrointestinal bleeding in cirrhotic patients. *Lancet*. 1995;346:865–8.
60. Stroo I, et al. Chemokine expression in renal ischemia/reperfusion injury is most profound during the reparative phase. *Int Immunol*. 2010 Jun;22(6):433-42.
61. Zhao L, Brinton RD. Suppression of proinflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in astrocytes by a V1 vasopressin receptor agonist: a cAMP response element-binding protein-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience*, March 3, 2004 • 24(9):2226 –2235.
62. Milanez MIO, Martins GR, Nishi EE, Bergamaschi CT, Campos RR. Differential sympathetic vasomotor control by spinal AT 1 and V1a receptors in the acute phase of hemorrhagic shock. *Eur J Pharmacol*. 2020 Jan 5;866:172819.
63. Aoyagi T, Koshimizu T-A, Tanoue A. Vasopressin regulation of blood pressure and volume: findings from V1a receptor-deficient mice. *Kidney Int*. 2009;76(10):1035–9.
64. Szczepanska-Sadowska E, Czarzasta K, Cudnoch-Jedrzejewska A. Dysregulation of the Renin-Angiotensin System and the Vasopressinergic System Interactions in Cardiovascular Disorders. *Curr Hypertens Rep*. 2018 Mar 19;20(3):19.