André Loureiro Rosário

**Efeito da ressuscitação volêmica precoce na resposta
inflamatória e no estresse oxidativo cardiovascular do choque
séptico experimental**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luciano César Pontes de
Azevedo

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rosário, André Loureiro

Efeito da ressuscitação volêmica precoce na resposta inflamatória e no estresse oxidativo cardiovascular do choque séptico experimental / André Loureiro Rosário. -- São Paulo, 2014.

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

Orientador: Luciano César Pontes de Azevedo.

Descritores: 1.Síndrome de resposta inflamatória sistêmica 2.Sepse
3.Choque séptico 4.Citocinas 5.Radicais livres 6.Superóxidos 7.Óxido nítrico
8.Estresse oxidativo 9.Hemodinâmica 10.Modelos animais 11.Ringer lactato

USP/FM/DBD-204/14

Dedicatória

*Sem dúvida nada teria alcançado sem o suporte de
meus pais Inácio e Denise, a importante participação de
meus irmãos Anderson e Giselle.*

*Sempre presentes em todos os momentos Rubens,
Cláudia, Eduardo e Arthur.*

*Nunca esquecer do amor incontestável de minha avó
Guilhermina.*

Agradecimentos

Esse trabalho foi uma força tarefa desempenhada por vários professores, laboratórios, técnicos e auxiliares. Citarei alguns nomes para representar todos os envolvidos uma vez que muitas pessoas desenvolveram importantes fases desse trabalho.

Ao doutor Luciano Azevedo principal responsável por minha transição entre um médico assistencial e um pesquisador incipiente. Sua paciência, competência, dedicação e em muitos momentos a “força motriz” de nosso trabalho. Ao doutor Guilherme Schettino por toda confiança e consideração em meu trabalho.

Aos doutores Marcelo Park e Alexandre Toledo que nos auxiliaram em muitos momentos de nosso estudo.

Ao doutores Reinaldo Salomão, Milena Brunialti, Marialice Mendes, Marjorie Raposo por toda dedicação, ensinamentos, discussões e aprendizados na bancada do Laboratório de Imunologia da divisão de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo.

Ao doutor Francisco Laurindo pelo apoio na realização dos experimentos no Laboratório de biologia vascular do Instituto de Coração da Universidade de São Paulo.

Aos técnicos de auxiliares do laboratório do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para a realização deste estudo.

Aos colegas e amigos por todo apoio e suporte nas trocas de plantões e paciência durante alguns atrasos gerados pelos inúmeros experimentos deste trabalho.

Normatização adotada

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: Serviço 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 SÍMBOLOS**LISTA DE TABELAS****LISTA DE FIGURAS****RESUMO****SUMMARY**

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	A resposta inflamatória da sepse.....	4
1.2	Estresse oxidativo cardiovascular na sepse.....	7
1.3	Ressuscitação volêmica precoce guiada por metas na sepse.....	8
2	HIPÓTESE.....	11
3.	OBJETIVOS.....	13
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1	Preparação dos Animais.....	16
4.2	Ressuscitação Volêmica.....	19
4.3	Avaliação da resposta inflamatória.....	22
4.3.1	Mensuração da concentração sérica de citocinas.....	23
4.3.2	Ensaio de apoptose em neutrófilos pela técnica de Anexina-V.....	23
4.3.3	Ensaio de metabolismo oxidativo em neutrófilos.....	24
4.3.4	Expressão de CD14 através da citometria de fluxo.....	25
4.4	Avaliação do perfil de estresse oxidativo cardiovascular.....	26
4.4.1	Mensuração de nitrato em plasma e homogenatos cardíacos.....	27
4.4.2	Quantificação do conteúdo de glutathiona no miocárdio.....	27
4.4.3	Determinação da Atividade NAD(P)H oxidase.....	28
4.4.4	Imunohistoquímica para nitrotirosina.....	29
4.5	Análise Estatística.....	30
5.	RESULTADOS.....	31
5.1	Resultados hemodinâmicos, respiratórios e metabólicos.....	32
5.2	Parâmetros inflamatórios.....	45
5.3	Estresse oxidativo cardiovascular.....	53
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÃO.....	64
8	BIBLIOGRAFIA.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(NO₃-)	Nitrato
APACHE II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II
BDIS	Solução de lise Becton Dickinson Immunocytometry Systems
BE	Excesso de base
BPM	Batimentos por minuto
C5a	Componente do complemento cinco ativado
DAB	Diaminobenzidina
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH	2'7'diclorofluoresceína
DCFH-DA	2'7'diacetato de diclorofluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO₂	Oferta de oxigênio
EGDT	Early Goal Directed Therapy
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FEVD	Fração de ejeção do ventrículo direito
FIO₂	Fração inspirada de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL 1	Canal de fotoluminescência 1 da citometria de fluxo
FL 3	Canal de fotoluminescência 3 da citometria de fluxo
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Dissulfito de glutathiona
HMGB 1	Proteína 1 do grupo box de alta mobilidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12

IL-8	Interleucina 8
IP	Iodeto de propídeo
IRVS	Índice de resistência vascular sistêmica
IS	Índice sistólico
ITSVD	Índice do trabalho sistólico de ventrículo direito
ITSVE	Índice do trabalho sistólico do ventrículo esquerdo
LPS	Lipopolissacarídeo
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NF-κB	Fator nuclear kapa beta
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAM	Pressão arterial média
PBMC	Células mononucleares periféricas
PBS	Solução tampão fosfatada
PEEP	Pressão expiratória final positive
PMA	Acetato de forbol-12 miristato
POAP	Pressão de oclusão da artéria pulmonar
ProCESS	Protocol-Based Care for Early Septic Shock
PVC	Pressão venosa central
RNA_m	ácido desoxiribonucleico mensageiro
SaO₂	Saturação arterial de oxigênio
ScvO₂	Saturação venosa central de oxigênio
SF	Soro Fisiológico
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SvO₂	Saturação venosa de oxigênio
TLR4	Toll-like receptor
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VDF	Volume diastólico final
VO₂	Consumo de oxigênio

	Pag.
Tabela 1. Parâmetros Hemodinâmicos dos animais durante o período de estudo.....	34
Tabela 2. Parâmetros Respiratórios, Metabólicos e Hematológicos dos animais durante o período de estudo.....	35

	Pag.
Figura 1. Algoritmo de tratamento para o grupo SvO ₂ . PAm: Pressão Arterial Sistêmica Média; PVC: Pressão Venosa Central; SvO ₂ : Saturação Venosa Mista de Oxigênio.....	21
Figura 2. Pressão Arterial Sistêmica Média de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos p=0.309, intra-grupos p<0.001 e interação fator-tempo p=0.809). As marcas cinza indicam todos os dados anotados. As marcas negras indicam os dados escolhidos previamente para serem analisados. * Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs basal. § Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs grupo controle.....	36
Figura 3. Saturação Venosa Mista de Oxigênio de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos p<0.001, intra-grupos p<0.001 e interação fator-tempo P = 0.426). As marcas cinza indicam todos os dados anotados. As marcas negras indicam os dados escolhidos previamente para serem analisados. * Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs basal. § Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs grupo controle.....	37
Figura 4. Pressão Venosa Central de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos p<0.001, intra-grupos p<0.001 e interação fator-tempo p=0.232). As marcas cinza indicam todos os dados anotados. As marcas negras indicam os dados escolhidos previamente para serem analisados. * Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs basal. § Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs grupo controle.....	38
Figura 5. Índice Cardíaco de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos p<0.001, intra-grupos p<0.001 e interação fator-tempo p=0.335). As marcas cinza indicam todos os dados anotados. As marcas negras indicam os dados escolhidos previamente para serem analisados. * Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs basal. § Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, p<0.05 vs grupo controle.....	39

Figura 6.	Diurese cumulativa de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p < 0.001$, intra-grupos $p < 0.001$ e interação fator-tempo $p = 0.374$). § Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs grupo controle.....	40
Figura 7.	Balanço Hídrico cumulativo de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p < 0.001$, intra-grupos $p < 0.001$ e interação fator-tempo $p = 0.041$). § Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs grupo.....	41
Figura 8.	Dosagem cumulativa de dobutamina durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p = 0.003$, intra-grupos $p < 0.001$ e interação fator-tempo $p = 0.003$). * Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs grupo controle.....	42
Figura 9.	Dosagem cumulativa de norepinefrina de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p < 0.001$, intra-grupos $p < 0.001$ e interação fator-tempo $p = 0.751$). * Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs choque..	43
Figura 10.	Tempo livre de norepinefrina e dobutamina durante as doze horas pós-choque em ambos os grupos. ¶ $p < 0.001$ vs grupo controle, teste T-Student.....	44
Figura 11.	Concentrações Plasmáticas de IL-6 em ambos os grupos. *Teste de Friedman $p = 0,002$, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ vs basal. #Teste de Friedman $p = 0,005$, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ vs basal.....	46
Figura 12.	Concentrações Plasmáticas de IL-10 em ambos os grupos. $p = \text{NS}$, teste de Friedman.....	47
Figura 13.	Concentrações Plasmáticas de nitrato em ambos os grupos. § Teste de Friedman $p = 0,042$, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ vs basal. ¶ Teste de Friedman $p = 0,041$, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ vs basal.....	48
Figura 14.	Expressão de CD14 em neutrófilos de ambos os grupos.....	49
Figura 15.	Metabolismo oxidativo em neutrófilos, de forma constitutiva e após incubação com <i>S. aureus</i> e forbol-12 miristato (PMA). § Teste de Friedman $p = 0,006$, análise pós-teste de Tukey $p < 0,05$ vs. choque (constitutiva).....	50
Figura 16.	Percentual de neutrófilos circulantes viáveis e apoptóticos em ambos os grupos durante o tratamento. $p = \text{NS}$, teste de Friedman.....	51

Figura 17.	Percentual de linfócitos circulantes viáveis e apoptóticos em ambos os grupos durante o tratamento. p=NS, teste de Friedman.....	52
Figura 18.	Painel A. Produção de superóxido no miocárdio em ambos os grupos. p=ns, Teste-t Student. Painel B. Produção de superóxido vascular em ambos os grupos. p=ns, Teste-t Student.....	53
Figura 19.	Painel A. Conteúdo de Glutathione miocárdica em ambos os grupos. p=ns, Teste-t Student. Painel B. Concentração de nitrato miocárdica em ambos os grupos. p=ns, Teste-t Student.....	54
Figura 20.	Imunohistoquímica para nitrotirosina em miocárdio de ambos os grupos (amostra representativa). Painel A. Grupo Controle. Painel B. Grupo SvO ₂	55
Figura 21.	Imunohistoquímica para nitrotirosina em artéria carótida de ambos os grupos (amostra representativa). Painel A. Grupo Controle. Painel B. Grupo SvO ₂	56

Rosário AL. Efeito da ressuscitação volêmica precoce na resposta inflamatória e no estresse oxidativo cardiovascular do choque séptico experimental. [tese]. São Paulo: "Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina"; 2014.

Os mecanismos fisiopatológicos associados aos efeitos benéficos da reanimação guiada pela saturação venosa mista de oxigênio (SvO₂) durante a sepse não são claros. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos de um algoritmo de reanimação guiado pela SvO₂ incluindo fluidos, noradrenalina e dobutamina na hemodinâmica, resposta inflamatória e estresse oxidativo cardiovascular durante um modelo experimental que se assemelha clinicamente ao choque séptico. Dezoito porcos anestesiados e cateterizados (35-45 kg) foram submetidos à peritonite por inoculação fecal (0,75 g/Kg). Depois de permanecerem hipotensos, antibióticos foram administrados e os animais foram randomizados em dois grupos: controle (n=9), com suporte hemodinâmico visando pressão venosa central de 8-12 mmHg, débito urinário de 0,5 ml/kg por hora, e pressão arterial média acima de 65 mmHg; e grupo SvO₂ (n=9), com os objetivos acima referidos, além de SvO₂ acima de 65%. As intervenções duraram 12 hs e incluíram Ringer Lactato e norepinefrina (ambos os grupos) e dobutamina (grupo SvO₂). A resposta inflamatória foi avaliada pela concentração plasmática de citocinas, expressão de CD14 de neutrófilos, geração de espécies reativas de oxigênio e apoptose. O estresse oxidativo foi avaliado pelas concentrações de nitratos no miocárdio e no plasma, a atividade miocárdica e vascular de NAD(P)H oxidase, conteúdo de glutatona do miocárdio e expressão de nitrotirosina. A reanimação guiada por SvO₂ foi associada com melhor índice sistólico, oferta de oxigênio e diurese. A sepse induziu em ambos os grupos um aumento significativo na concentração de IL-6, nas concentrações de nitrato de plasma e diminuição persistente na expressão de CD14 em neutrófilos. A apoptose e a geração de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos não foram diferentes entre os grupos. As estratégias de tratamento não alteraram significativamente os parâmetros de estresse oxidativo. Assim, uma abordagem destinada a otimizar a SvO₂ durante a sepse melhora a hemodinâmica, porém sem qualquer efeito significativo sobre a resposta inflamatória e estresse oxidativo. Os efeitos benéficos associados a esta estratégia podem estar relacionados a outros mecanismos.

Unitermos: síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sepse, choque séptico, citocinas, radicais livres, superóxidos, óxido nítrico, estresse oxidativo, hemodinâmica, modelos animais, ringer lactato.

Summary

Rosário AL. SvO₂ guided resuscitation for experimental septic shock: effects of fluid infusion and dobutamine on hemodynamics, inflammatory response and cardiovascular oxidative stress. [thesis]. São Paulo: "Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina"; 2014.

The pathogenetic mechanisms associated to the beneficial effects of mixed venous oxygen saturation (SvO₂)-guided resuscitation during sepsis are unclear. Our purpose was to evaluate the effects of an algorithm of SvO₂-driven resuscitation including fluids, norepinephrine and dobutamine on hemodynamics, inflammatory response and cardiovascular oxidative stress during a clinically resembling experimental model of septic shock. Eighteen anesthetized and catheterized pigs (35-45 Kg) were submitted to peritonitis by fecal inoculation (0.75 g/Kg). After hypotension, antibiotics were administered, and the animals were randomized to two groups: control (n=9), with hemodynamic support aiming central venous pressure 8 to 12 mmHg, urinary output 0.5 ml/Kg per hour, and mean arterial pressure greater than 65 mmHg; and group SvO₂ (n =9), with the goals above, plus SvO₂ greater than 65%. The interventions lasted 12 h, and lactated Ringer's and norepinephrine (both groups) and dobutamine (SvO₂ group) were administered. Inflammatory response was evaluated by plasma concentration of cytokines, neutrophil CD14 expression, oxidant generation, and apoptosis. Oxidative stress was evaluated by plasma and myocardial nitrate concentrations, myocardial and vascular NAD(P)H oxidase activity, myocardial glutathione content, and nitrotyrosine expression. Mixed venous oxygen saturation-driven resuscitation was associated with improved systolic index, oxygen delivery, and diuresis. Sepsis induced in both groups a significant increase on IL-6 concentrations and plasma nitrate concentrations and persistent decrease in neutrophil CD14 expression. Apoptosis rate and neutrophil oxidant generation were not different between groups. Treatment strategies did not significantly modify oxidative stress parameters. Thus, an approach aiming SvO₂ during sepsis improves hemodynamics, without any significant effect on inflammatory response and oxidative stress. The beneficial effects associated with this strategy may be related to other mechanisms.

Keywords: systemic inflammatory response syndrome, sepsis, shock septic, cytokines, free radicals, superoxides, nitric oxide, oxidative stress, hemodynamics, models animal, Ringer's lactate.

1 Introdução

O termo sepse é originário de uma palavra grega que significa pútrido. Esse termo foi utilizado inicialmente no século XIX quando um paciente faleceu após a inferência de que toxinas de uma ferida de pele pútrida teriam alcançado a corrente sanguínea (septicemia) (FINK et al, 2005).

Do ponto de vista conceitual, sepse é a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) desencadeada por um quadro infeccioso. A SIRS, por sua vez, é definida por: temperatura corporal maior ou igual a 38°C ou menor que 36°C; frequência cardíaca maior que 90 batimentos por minuto; frequência respiratória maior que 20 incursões respiratórias por minuto ou pressão parcial arterial de dióxido de carbono (PCO_2) menor que 32mmHg; e contagem de leucócitos maior que 12000 células ou menor que 4000 células ou mais de 10% de formas jovens dos leucócitos em sangue periférico. Por seu turno, a sepse grave é a presença de uma nova disfunção orgânica secundária a um quadro infeccioso. Choque séptico é a sepse associada à hipotensão arterial não responsiva a uma prova de volume adequada, de tal modo que há necessidade de se utilizar drogas vasoativas para normalizar a pressão arterial (LEVY et al 2010).

A sepse grave é responsável pela morte de milhões de indivíduos em todo o mundo por ano, com aumento anual dessa incidência. Aproximadamente vinte e cinco por cento daqueles indivíduos que evoluem a choque séptico morrem. Portanto é uma doença altamente prevalente, incidente e letal. Assim como em doenças mundialmente prevalentes como infarto agudo do miocárdio e o politrauma, a sepse grave e o choque séptico

merecem especial atenção em sua abordagem inicial (DELLINGER et al, 2008).

O suporte hemodinâmico de pacientes com sepse grave e choque séptico mudou significativamente a partir de 2001. Nesse ano, Rivers e colaboradores desenvolveram uma estratégia hemodinâmica de abordagem precoce da sepse grave e do choque séptico que a partir daquele ano mudou os paradigmas do tratamento dessa doença. Tal estratégia é internacionalmente conhecida como Early Goal-Directed Therapy (EGDT) ou em português terapia precoce guiada por metas (RIVERS et al, 2001).

Esses autores sugeriram que durante as horas iniciais do tratamento da sepse grave e do choque séptico a equipe multidisciplinar que acompanharia tal paciente deveria buscar alvos objetivamente estabelecidos naquele estudo, quais sejam: pressão venosa central (PVC) em torno de 8-12mmHg, pressão arterial média (PAM) maior ou igual a 65mmHg, débito urinário maior ou igual a 0,5ml/Kg/h, saturação venosa central de oxigênio(SvcO₂) maior ou igual a 70%. Mesmo que para alcançar tais alvos fosse necessário ressuscitação volêmica agressiva, uso de suplementação de oxigênio para manter uma saturação arterial de oxigênio(SaO₂) maior ou igual a 93%, garantir um débito cardíaco normal para cada paciente mesmo que as custas do uso de dobutamina e ainda se houver necessidade transfusão de hemoderivados para garantir um hematócrito maior ou igual a 30%.

Com essa estratégia os autores conseguiram reduzir de forma significativa a mortalidade da sepse grave e do choque séptico em sua população estudada. No grupo EGDT a mortalidade hospitalar foi de 30,5%, enquanto no grupo controle a mortalidade foi de 46,5% (RIVERS et al, 2001).

A partir daquela publicação uma série de outros estudos se seguiu na última década para tentar entender o real motivo da redução da mortalidade daquela amostra de pacientes estudada. Alguns estudos tentaram reproduzir a estratégia de terapia guiada por metas, outros tentaram encontrar algum mecanismo relacionado à fisiopatologia da sepse que fosse modulado pela terapia guiada por metas, visto que o estudo de Rivers não indicava de forma conclusiva quais mecanismos fisiopatológicos estariam sendo melhorados pela intervenção (RIVERS et al, 2007). Uma breve descrição dos principais mecanismos fisiopatológicos da sepse faz-se necessária.

1.1 A resposta inflamatória da sepse

A resposta inflamatória desencadeada pela chegada de um patógeno ou de suas toxinas ao nosso organismo é genericamente denominada sepse. Na sepse há um importante desequilíbrio entre as vias pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, o que vai desencadear disfunção endotelial, comprometimento cardiocirculatório, disfunção de metabolismo mitocondrial, hipóxia celular e apoptose. Hipóxia celular e apoptose são responsáveis pela disfunção de múltiplos órgãos e esta pelo óbito de muitos pacientes (HOTCHKISS et al, 2003).

Bactérias, fungos, parasitas, vírus podem invadir nosso organismo e desencadear uma resposta imunológica mediada pela via inata de nosso sistema de defesa a partir da ativação de macrófagos ou de células apresentadoras de antígenos.

O modelo hoje mais estudado para explicar a resposta inflamatória da sepse é o modelo de ligação do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular das bactérias gram-negativas com linfócito T CD14 e toll-like receptor 4 (TLR4). A ligação do LPS ao TLR4 induz a ativação de uma via intracelular mediada principalmente pela ativação do fator nuclear kappa-beta (NF- κ B). O NF- κ B ativado migra para o núcleo sinalizando a transcrição de inúmeras citocinas e mediadores pró-inflamatórios. As principais citocinas pro-inflamatórias estimuladas são fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina -8 (IL-8), fator ativador de plaquetas (PAF), componente ativado 5 do complemento (C5a) (CARTWRIGHT et al, 2007), fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) (SPRONG et al, 2007).

A primeira fase da resposta inflamatória associada à sepse após a liberação dos primeiros mediadores inflamatórios é a migração de leucócitos para o sítio de infecção. Como já mencionado, a ligação dos antígenos bacterianos ao TLR das células apresentadoras de antígenos desencadeia uma série de reações intracelulares através da ativação do NF- κ B, o qual sinaliza a transcrição de inúmeros RNAs para a síntese de novas citocinas (TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, e IL-8). A ligação do LPS ao TLR4 desencadeia a liberação de óxido nítrico sintase induzível, a qual deflagra a produção de óxido nítrico nas células do sistema imunológico e nas células dos vasos sanguíneos (CARTWRIGHT et al, 2007).

A resposta de fase aguda é desencadeada majoritariamente pelo TNF α , IL-1 e IL-6. TNF α e IL-1 agem sobre o endotélio e os vasos sanguíneos além de ativarem a cascata da coagulação. O TNF α age ainda estimulando a

ativação intracelular de novo de NF- κ B via receptor de TNF tipo 1 e 2 na membrana celular. O NF- κ B aumenta a ação pró-apoptose do TNF α (MOSHAGE, 1997).

A migração dos leucócitos ao sítio de infecção é facilitada por uma série de ações conjuntas a seguir descritas: o óxido nítrico promove vasodilatação das arteríolas e capilares o que reduz a velocidade de fluxo do sangue naquela região, a IL-1 e o TNF α estimulam a produção de moléculas de adesão nas células do endotélio. A transmigração dos neutrófilos é um passo importante no clearance das bactérias no sítio de infecção (BESTEBROER et al, 2007).

O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), outra citocina produzida durante a sepse quando em níveis elevados sinaliza maior gravidade do quadro séptico. O MIF pode ser produzido localmente pelos linfócitos T, tendo mais recentemente sido identificada produção desta citocina em células da adenohipofise. O MIF é um dos responsáveis por uma resposta imunológica exacerbada uma vez que estimula expressão dos TLR4 (SPRONG et al, 2007).

Outra proteína atualmente identificada numa fase mais tardia da resposta inflamatória é a proteína 1 do grupo box de alta mobilidade (HMGB1). HMGB1 pode deflagrar a sinalização via TLR representando um possível novo insulto ao organismo pela cascata inflamatória (QIN et al, 2006).

A resposta de fase aguda é marcada pela produção de uma gama enorme de proteínas pelos tecidos quando estimulados pela IL-1, IL-6 e TNF α . Essa resposta é marcada por febre, leucocitose ou leucopenia,

gliconeogenese, catabolismo muscular, alteração no metabolismo dos lipídeos, ativação do complemento e da cascata da coagulação (MOSHAGE, 1997).

A apoptose desencadeada pela ação dos mediadores inflamatórios é um importante mecanismo de lesão tecidual fazendo parte das possíveis alterações teciduais que produzem a disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (FAULKNER et al, 2007).

1.2 Estresse oxidativo cardiovascular na sepse

Outros dos mecanismos fisiopatológicos da sepse que vem recebendo considerável atenção nos últimos anos é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio. Além da produção de NO pela óxido-nitrico sintase induzível, já descrita, as últimas décadas tem demonstrado que a produção de espécies reativas de oxigênio (superóxido, ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio) pelas células inflamatórias e pelos tecidos durante a sepse desempenha um papel considerável na fisiopatologia do processo. Estudos prévios já identificavam um “burst” oxidativo aumentado de neutrófilos de pacientes sépticos e essa produção aumentada de EROS poderia se correlacionar à destruição celular e lesão orgânica (AZEVEDO et al, 2006). Contudo, a produção vascular de EROS na sepse é relativamente pouco estudada. Brandes et al identificaram uma produção aumentada de EROS pela vasculatura de coelhos endotoxêmicos, produção esta originada da ativação de xantina-oxidase e NADPH oxidase da parede vascular (BRANDES et al, 1999). Do mesmo modo, foi identificado aumento da produção vascular de superóxido

por ratos e porcos endotoxêmicos (JAVESGHANI et al, 2003). Pacientes com choque séptico são, ainda, capazes de produzir micropartículas de origem plaquetária, as quais são potentes indutoras de apoptose de células endoteliais e musculares lisas por um mecanismo dependente de EROS (JANISZEWSKI et al, 2004). Essas micropartículas sépticas são também capazes de induzir disfunção miocárdica em preparações ex-vivo de coração isolado e músculo papilar (AZEVEDO et al, 2007). Contudo, apesar do renovado interesse no estudo das EROS em sepse, o efeito de intervenções terapêuticas consagradas sobre a produção cardiovascular de EROS ainda não foi determinado.

1.3 Ressuscitação volêmica precoce guiada por metas na sepse

O Early Goal-Directed Therapy (EGDT) ou terapia precoce guiada por metas é uma estratégia de tratamento da sepse grave e do choque séptico marcada por metas objetivamente estabelecidas. O EGDT é alcançado a partir de ajustes na pré-carga cardíaca, na contratilidade miocárdica e no balanço entre oferta e consumo de oxigênio. O racional fisiopatológico da cadeia de intervenções é baseado na noção de que os pacientes sépticos apresentam uma hipóxia tecidual global que comumente não é identificada pelos marcadores habituais de perfusão como pressão venosa central (PVC), débito urinário e pressão arterial. Assim, este estudo buscou um novo marcador de balanço oferta/consumo de oxigênio, qual seja a saturação venosa central de oxigênio (ScvO₂) e teve como objetivo avaliar se essa estratégia guiada por

metas era efetiva quando instituída imediatamente após a admissão do paciente na sala de emergência (RIVERS et al, 2001).

Assim, foram randomizados todos os pacientes que chegavam à unidade de emergência com diagnóstico de sepse grave ou choque séptico entre os grupos EGDT e terapia padrão por seis horas antes de sua transferência para a unidade de terapia intensiva. O objetivo do estudo era avaliar a mortalidade intra-hospitalar e dados sobre as estratégias de ressuscitação. Os parâmetros evolutivos foram obtidos seriadamente por 72 horas e comparados entre os dois grupos. Como já mencionado, os alvos hemodinâmicos do grupo EGDT foram: pressão venosa central (PVC) em torno de 8-12mmHg, pressão arterial média (PAM) maior ou igual a 65mmHg, débito urinário maior ou igual a 0,5ml/Kg/h, saturação venosa central de oxigênio(ScvO₂) maior ou igual a 70%. Por sua vez, o grupo terapia padrão utilizou os mesmos marcadores, com exceção da saturação venosa central (RIVERS et al, 2001) .

Dos 263 paciente estudos, 130 pacientes foram randomizados para o grupo EGDT e 133 pacientes foram randomizados para o grupo tratamento padrão. Não havia diferença estatisticamente significante entre os dois grupos quanto as características demográficas e clínicas (RIVERS et al, 2001) .

A mortalidade intra-hospitalar foi de 30,5 por cento no grupo EGDT e 46,5% no grupo tratamento padrão, com diferença estatisticamente significativa. A terapia EGDT cursou com menos hiperlactatemia, redução do déficit de bases e da acidemia, bem como menos disfunções orgânicas no grupo EGDT quando mensuradas pelo escore APACHE II. Com esses dados os autores concluíram que a Early Goal Directed Therapy promovia benefícios clínicos

relacionados ao objetivo primário do estudo que foi mortalidade intra-hospitalar nos pacientes com sepse grave e choque séptico (RIVERS et al, 2001). Contudo, mais recentemente tal tratamento encontra-se sob considerável controvérsia na literatura, entre outros motivos por haver uma escassez de estudos que identifiquem de forma clara os mecanismos fisiopatológicos pelo qual a terapia EGDT é benéfica aos pacientes com sepse na fase inicial.

A hipótese deste estudo é que a ressuscitação volêmica precoce guiada por metas no tratamento da sepse melhora o desequilíbrio entre oferta/consumo de oxigênio e reduz a hipoxia tecidual oculta. Assim, tal estratégia associa-se a um melhor perfil hemodinâmico, uma menor resposta inflamatória e uma redução do estresse oxidativo cardiovascular.

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da terapia precoce guiada por metas (EGDT) em um modelo de choque séptico experimental similar à doença humana, em termos de perfil hemodinâmico global, resposta inflamatória e estresse oxidativo nesse animais.

4 Materiais e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Hospital Sirio-Libanês e foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Medicina Intensiva e Anestesiologia do Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes para cuidados e uso de animais de laboratório. Este estudo baseia-se em um modelo experimental de peritonite fecal previamente descrito (AZEVEDO et al, 2007).

4.1 Preparação dos Animais

Foram realizados três experimentos piloto para adequação do modelo e validação da metodologia laboratorial e cada grupo do estudo foi composto por 9 animais. Assim, 21 porcos da raça Large White de ambos os sexos pesando em torno de 40 Kg foram mantidos em jejum por 18 horas com livre acesso à água. Os animais foram pré-anestesiados por via intramuscular com midazolam e acepromazina. A seguir, foram sedados com tiopental, submetidos à intubação orotraqueal, mantidos com infusão contínua de tiopental (10 mg/kg/h) e fentanil (10 mcg/kg/h) e sob paralisia muscular com pancurônio (dose inicial de 0,15 mg/kg seguida de infusão contínua de 0,25 mg/kg/h) enquanto durasse o procedimento cirúrgico. Após a estabilização, foram mantidos com tiopental e pancurônio nas doses já descritas. A seguir, foram conectados a um ventilador mecânico (Evita XL, Dräger Medical, Lübeck, Alemanha), com uma pressão expiratória final positiva (PEEP) fixa de 5 cm H₂O

e FiO_2 de 30%, mantidos com um volume corrente em torno de 8 ml/kg e frequência respiratória ajustada para uma PaCO_2 em torno de 35 a 45 mmHg. Se ocorresse redução significativa da saturação arterial e/ou PaO_2 durante o estudo, a FiO_2 seria elevada para o mínimo necessário para manter uma saturação arterial acima de 92%. A seguir, os animais foram conectados a monitor multiparamétrico para monitorização de frequência cardíaca, saturação arterial e curvas de pressão venosa central e artéria pulmonar após passagem do cateter de artéria pulmonar (DX2020, Dixtal Biomédica, Manaus, Brasil).

A seguir, foi realizada a dissecação dos acessos vasculares. Através da veia jugular externa direita, foi introduzido por visualização das curvas pressóricas um cateter de artéria pulmonar com mensurações contínuas de débito cardíaco e saturação venosa de oxigênio, bem como de volume diastólico final de ventrículo direito e fração de ejeção de ventrículo direito (Vigilance VD[®], Edwards Lifesciences LLC, Irvine, California, Estados Unidos). Através da artéria femoral direita foi introduzido um cateter para monitorização da pressão arterial invasiva e coleta de amostras de sangue arterial. A veia femoral direita foi cateterizada para infusão endovenosa de fluidos e medicamentos e coleta de sangue venoso. Através de uma cistostomia foi inserido um cateter para monitorização do débito urinário.

Imediatamente após a monitorização os animais foram submetidos a laparotomia mediana por uma incisão de cerca de 4 cm. A seguir, o cólon descendente do animal foi visualizado, foi realizada uma incisão de 2 cm e 0,75 g/kg de fezes foram retiradas, sendo o intestino suturado a seguir. Foram inseridos dois cateteres de grosso calibre na cavidade peritoneal na altura de goteiras parietocólicas bilaterais e a incisão foi então fechada. Após 60 minutos

de estabilização, uma quantidade equivalente a 0,75 g/kg de fezes foi diluída em 200 ml de SF a 37°C e introduzida na cavidade peritoneal através dos cateteres. Após a peritonite e juntamente com o início da ressuscitação volêmica, todos os animais do estudo receberam por via endovenosa amicacina (250 mg mantidos a cada 12 horas) e metronidazol (500 mg mantidos a cada 8 horas) durante toda a duração do experimento.

Imediatamente antes da indução da peritonite e a cada 60 minutos após, foram mensurados os seguintes parâmetros: frequência cardíaca, débito cardíaco por termodiluição, volume diastólico final de ventrículo direito, fração de ejeção de ventrículo direito, pressão venosa central, pressão capilar pulmonar, pressão de artéria pulmonar, pressão arterial média, saturação venosa mista, temperatura central, diurese, concentração de CO₂ por capnometria, saturação arterial de oxigênio, PEEP e fração inspirada de oxigênio.

Foram mensuradas as concentrações de gases arteriais, lactato arterial, hemoglobina/hematócrito e eletrólitos antes da indução da sepse e a cada 3 horas até o óbito. Gasometrias venosas centrais foram colhidas antes da peritonite (para calibração do sistema de monitorização contínua de SvO₂) e a seguir a cada doze horas.

4.2 Ressuscitação Volêmica

Durante toda a duração do estudo, os animais receberam, a cada 24 horas, uma infusão de manutenção de 1000 ml de solução de glicose a 10% contendo cloreto de potássio 25 mEq e cloreto de sódio 75 mEq, com o objetivo de manter os valores de glicemia, potássio e sódio em níveis próximos ao normal.

Durante o tempo cirúrgico e o período de estabilização os animais receberam infusão de solução de ringer lactato de tal forma que o protocolo se iniciou com PVC acima de 8 mmHg e SvO₂ acima de 70%. Após a indução de peritonite, os animais não receberam nenhum tipo de solução para reposição volêmica, a não ser a infusão de soro glicosado de manutenção. Uma vez que, em virtude da evolução da sepse, a pressão arterial média (PAM) atingisse um valor abaixo de 65 mmHg por 30 minutos os animais foram randomizados através de envelopes selados para uma das duas estratégias de ressuscitação:

- *Grupo Controle (n=9):*

Foi iniciada reposição volêmica com bolus de 500 ml de ringer lactato a cada 30 minutos, com o objetivo de se atingir e manter em até 6 horas os parâmetros considerados adequados de volemia, a saber: PAM acima de 65 mmHg, pressão venosa acima de 8 mmHg e diurese acima de 0,5 ml/kg/h. Noradrenalina foi acrescentada após 30 minutos de hipotensão inicialmente a 0,025 mcg/kg/min e aumentada em 0,025 mcg/kg/min a cada 15 minutos, caso necessário, para manutenção de PAM acima de 65 mmHg. Os animais foram mantidos com esses parâmetros até o óbito ou durante 12 horas (contadas a

partir do momento em que a ressuscitação for completada), findas as quais foram sacrificados com overdose de cloreto de potássio, após aprofundamento da anestesia. Nesse intervalo, receberam acompanhamento contínuo 24 horas da equipe de investigadores do estudo.

- *Grupo Ressuscitação guiada por SvO₂ (n=9)*

Nesse grupo, a ressuscitação volêmica foi baseada no valor da saturação venosa mista de oxigênio obtido pelo cateter de artéria pulmonar com saturação venosa contínua, além dos mesmos objetivos hemodinâmicos citados acima. Assim, os critérios para ressuscitação adequada foram os seguintes: PAM maior que 65 mmHg, diurese acima de 0,5 ml/kg/h, PVC acima de 8 mmHg e SvO₂ maior que 65%. Esses objetivos hemodinâmicos foram mantidos durante todo o estudo. Inicialmente esses animais receberam bolus de 500 ml de ringer lactato a cada 30 minutos até atingir valores de PVC acima de 8 mmHg. A seguir, receberam noradrenalina nas doses descritas acima para manter PAM acima de 65 mmHg. Se a saturação venosa se mantivesse ainda abaixo de 65% com fluidos e vasopressores, receberiam dobutamina com início da infusão em 2,5 mcg/kg/min e incrementos de 2,5 mcg/kg/min a cada 30 minutos até dose máxima de 20 mcg/kg/min. Se durante a infusão de dobutamina ocorresse queda da PVC, receberiam novamente bolus de cristalóide até atingir os valores de PVC já descritos. O incremento da infusão de dobutamina foi limitado por taquicardia acima de 180 bpm. A Figura 1 esquematiza o algoritmo de suporte hemodinâmico do grupo de ressuscitação guiada por SvO₂.

Figura 1. Algoritmo de tratamento para o grupo SvO₂. PAm: Pressão Arterial Sistêmica Média; PVC: Pressão Venosa Central; SvO₂: Saturação Venosa Mista de Oxigênio.

4.3 Avaliação da resposta inflamatória

Nesse segmento do estudo, o objetivo foi avaliar o efeito da ressuscitação volêmica guiada pela saturação venosa de oxigênio no grau de resposta inflamatória por meio das mensurações abaixo discriminadas. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia em Doenças Infecciosas da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, sob a orientação do Prof. Dr. Reinaldo Salomão.

De cada animal foram coletadas amostras de sangue arterial ou venoso periférico em tubos estéreis com 100U de heparina (10 ml/tubo). Em todos os experimentos deste segmento com exceção da concentração de citocinas, o sangue foi colhido antes da peritonite, imediatamente antes da ressuscitação volêmica e após 12 horas de ressuscitação.

Parte dos experimentos foi feita em sangue total (estudos de imunofenotipagem em monócitos e neutrófilos e estudos de metabolismo oxidativo em neutrófilos) e parte em células mononucleares (PBMC) e neutrófilos (apoptose) isolados. A separação de neutrófilos e células mononucleares (PBMC) foi realizada por gradiente de Ficoll-Paque.

4.3.1 Mensuração da concentração sérica de citocinas

A coleta de sangue se deu imediatamente antes, após três e 6 horas da indução da peritonite, imediatamente antes da ressuscitação e a cada 3 horas a seguir. O nível sérico das citocinas circulantes (TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10) foi realizado através de técnica de ensaio imunológico ligado à enzima (ELISA), utilizando-se para tal fim anticorpos espécie-específicos (R&D Diagnostics, Minnessota, EUA).

4.3.2 Ensaio de apoptose em neutrófilos pela técnica de Anexina-V

Os neutrófilos foram suspensos em tampão de anexina corrigindo-se o volume para uma concentração final de 2×10^6 células / ml de solução.

Após a suspensão das células em tampão de anexina, nos tubos utilizados no ensaio de apoptose por anexina-V (Kit I Annexin-V FITC Apoptosis Detection, PharMingen, California, EUA) adicionou-se Anexina-V, iodeto de propídeo, ambos (dupla marcação) e estes foram incubados por 20 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após, foi acrescentado 400 μ l de tampão de anexina.

Em seguida as amostras foram processadas em citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton-Dickinson, Nova Jersey, EUA). A aquisição dos dados foi realizada através das dispersões frontal (FSC, forward scatter) e lateral de luz (SSC, side scatter) que representam, respectivamente, o tamanho e a

granulosidade das células. Para analisar a apoptose, foram utilizados os canais FL-1 para a anexina-V FITC e FL-3 para o iodeto de propídeo. As células foram analisadas em gráficos tipo dotplot de acordo com a positividade para iodeto de propídeo e anexina, considerando-se, primeiro, que durante a apoptose, resíduos de fosfatidilserina que normalmente se localizam na camada interna da membrana celular, são transportados para o exterior da camada bilipídica e, a anexina-V FITC liga-se tanto aos resíduos de fosfatidilserina presentes no exterior das células apoptóticas quanto àqueles presentes na face interna da membrana que perdeu sua integridade durante os estágios finais da apoptose ou durante o processo de necrose. O iodeto de propídeo (IP) liga-se ao DNA das células que perderam sua integridade. Dessa forma, células coradas com iodeto de propídeo são consideradas inviáveis. Células positivas para anexina e negativas para iodeto de propídeo são consideradas em apoptose, e células positivas para ambos são consideradas em processo de apoptose tardia com a membrana celular em desintegração. As células que não se coram por iodeto de propídeo e nem por anexina são consideradas viáveis.

4.3.3 Ensaio de metabolismo oxidativo em neutrófilos

Para a mensuração do metabolismo oxidativo, foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizando o fluorocromo 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). O DCFH-DA tem a propriedade de penetrar rapidamente nas células por meio de difusão. Uma vez no espaço intracelular, é hidrolisado por esterases intracelulares transformando-se em

2'7'-diclorofluoresceína (DCFH) que é um composto não fluorescente e impermeável à membrana celular. Este, por sua vez, reage com as ERO, em particular com o peróxido de hidrogênio, sofrendo oxidação, resultando em um composto altamente fluorescente, diclorofluoresceína (DCF), cuja luz é captada no canal FL-1 do citômetro de fluxo. Nos ensaios foram observadas a produção espontânea de espécies reativas de oxigênio, bem como a produção após estímulo com acetato de forbol-12 miristato (PMA) e com as cepas de *S. aureus* utilizadas no ensaio de fagocitose. A aquisição foi realizada conforme descrito no ensaio de apoptose.

4.3.4 Expressão de CD14 através da citometria de fluxo

A expressão do marcador de superfície CD14 foi avaliada em sangue total. Para tanto, as amostras foram marcadas com os anticorpos monoclonais de superfície e incubadas por 15 minutos no escuro. Foram então acrescentados 2 ml de solução de lise (BDIS) e incubados durante 15 minutos em temperatura ambiente para lise das hemácias. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Em seguida foram acrescentados aos tubos 2 ml de solução tampão fosfatada (PBS; 0,15 M [NaCl 8,0 g; KH₂PO₄ 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,15 g; KCl 0,2 g; água destilada q.s.p. 1000 ml; pH = 7,2]), sendo novamente centrifugados e lavados em 2 ml de PBS. As células foram suspensas em 0,3 ml de PBS a 1% azida de sódio.

A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur. O citômetro é acoplado à unidade constituída por microcomputador Macintosh

Power PC, modelo 7300/200 (Apple Computer Inc., California, EUA). Foram adquiridos de 5.000 a 15.000 eventos em cada condição. Tanto a aquisição dos eventos como a análise dos resultados foram realizadas com auxílio do programa CellQuest (Becton-Dickinson, Nova Jersey, EUA).

4.4 Avaliação do perfil de estresse oxidativo cardiovascular

Os experimentos para avaliação do estresse oxidativo foram realizados no Laboratório de Biologia Vascular do InCor-HCFMUSP, sob a supervisão do Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo.

Uma vez terminado o período do estudo, os animais foram dissecados e foram retirados fragmentos da artéria carótida esquerda, direita, femoral esquerda e do miocárdio os quais foram dissecados em tampão Krebs-Hepes a 4°C (composição: NaCl 120,0 mM; KCl 4,7 mM; CaCl₂ 1,9 mM; NaHCO₃ 25,0 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 1,05 mM; glicose 11,1 mM; Hepes 20 mM) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

Tais experimentos em sua maioria utilizaram homogenatos cardíacos e vasculares. Esses homogenatos foram realizados através de lise tecidual com triturador, seguida de diluição em 3,0 ml de tampão Tris-HCl 50 mM com PMSF 1 mM e 0,1% mercaptoetanol. O tecido lisado foi submetido à centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos, a 4°C para remoção de debris e células não lisadas. O sobrenadante foi recolhido e submetido à quantificação de proteínas por ensaio colorimétrico (Bradford, Bio-Rad, California, Estados Unidos). Todos os

resultados foram normalizados para a concentração de proteínas das amostras.

4.4.1 Mensuração de nitrato em plasma e homogenatos cardíacos

Amostras de plasma dos animais (colhidas antes, após 12 horas de peritonite e próximo ao fim do experimento) e amostras de homogenato cardíaco tiveram sua quantificação de nitrato (NO_3^-) mensurada utilizando-se a técnica de quimioluminescência por meio do analisador de NO (Sievers, modelo NOA280, Colorado, EUA). Essa técnica requer a redução de nitrito e nitrato a NO, o qual reage com ozônio para gerar luz, que é quantificada por fotomultiplicadoras. Para conversão do nitrato a NO, foi utilizada reação com cloreto de vanádio (VnCl_4) em ácido clorídrico a 95°C e para redução do nitrito a NO foi usado iodeto de potássio (KI) em ácido acético. A curva de calibração em níveis múltiplos foi realizada por padrão externo (nitrito e nitrato de sódio – Aldrich, EUA), utilizando-se programa específico (Sievers, versão 2.2, EUA). Os resultados dos homogenatos foram normalizados para a concentração de proteínas presente nas amostras.

4.4.2 Quantificação do conteúdo de glutathiona no miocárdio

A quantificação do conteúdo de glutathiona cardíaco foi realizada através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Amostras de

homogenatos miocárdicos tiveram seu conteúdo protéico precipitado através da diluição em partes iguais com ácido tricloroacético a 10% e centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. A análise por cromatografia foi realizada com auxílio de um sistema de HPLC (Waters Co., Massachusetts, EUA), constituído por duas bombas 515, acopladas ao detector de UV-visível 2996. As amostras foram submetidas à separação cromatográfica usando uma coluna X-Terra (4.5 x 250 mm; 5 µm). Como fase móvel foi utilizada solução de 100 mM KH_2PO_4 (pH 2,5), 200 mg/l heptanossulfonato de sódio, 5 mg/l EDTA em 1% metanol (v/v), em fluxo de 0.5 ml/min. A eluição do GSH foi monitorada com detecção eletroquímica (potencial de oxidação GSH, 600 mV). Os compostos foram identificados e quantificados pela comparação de seu tempo de retenção com padrão autêntico submetido às mesmas condições cromatográficas. A análise de GSSG foi realizada indiretamente pela sua redução enzimática a GSH pela glutathione redutase (0,6 U/ml)/ NADPH (0,2 mg/ml) por 30 min. A quantificação do GSSG será inferida pela diferença do GSSG total reduzido em relação ao GSH total das mesmas amostras, considerando-se a estequiometria 2GSH/GSSG.

4.4.3 Determinação da Atividade NAD(P)H oxidase

A atividade de NAD(P)H oxidase foi medida por HPLC. Fragmentos cardíacos e vasculares foram homogeneizados, centrifugados e ultracentrifugados para obter uma fração enriquecida em membrana. Para a análise por HPLC, a fração de membrana (20 µg de proteína) foi incubada com

dihidroetidio (100 μ M) e NADP(H) (100 μ M). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma Coluna Phenomenex C18 em um sistema de HPLC (Waters Co, Milford, Massachussets, EUA). A quantificação foi realizada por comparação das áreas de pico integradas entre o obtido e soluções-padrão. Os resultados foram expressos como 2-hidroxietidio em nanomoles por micrograma de proteína.

4.4.4 Imunohistoquímica para nitrotirosina

A formação de nitrotirosina é um indicativo indireto da produção de peroxinitrito, composto produzido pela reação do superóxido com o óxido nítrico. Nesses experimentos, fragmentos miocárdicos e vasculares previamente fixados em formol tamponado a 4% foram submetidos a estudo imunohistoquímico com anticorpos específicos para nitrotirosina (Upstate biotechnology, Virginia, EUA). Os fragmentos fixados em parafina foram colocados em lâminas e secados à temperatura ambiente. A seguir, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (3%) em solução aquosa (duas trocas de 5 minutos). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas não-específicas com soro fetal bovino não-imune por 30 minutos. Os fragmentos teciduais foram então incubados com anticorpo primário diluído em solução de albumina bovina por 18 horas, lavados e em seguida incubados com anticorpo secundário biotinilado por 30 minutos. Após nova lavagem, foram incubados com reagente terciário (avidina conjugada a peroxidase) por

uma hora, sendo a seguir revelados com o cromógeno diaminobenzidina (DAB), com posterior montagem dos fragmentos em meio permanente.

4.5 Análise Estatística

Os dados considerados normais usando o teste Kolmogorov-Smirnov foram apresentados em média e desvio padrão. Dados não pareados tais como variáveis de estresse oxidativo cardiovascular foram comparados com o teste t de Student, e um $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise de evolução temporal inter-grupo, intra-grupo e a interação fator-tempo foi realizada utilizando-se a análise de duas vias de variância (ANOVA). A correção de Bonferroni para comparações múltiplas foi utilizada com ANOVA de duas vias, e para estas comparações seis pontos de tempo (basal, choque, 3, 6, 9 e 12 h) foram escolhidos *a priori*. Nessas análises, a significância estatística foi considerado como sendo $p < 0,008$ para os três níveis de análise (inter-grupo, intra-grupo e interação fator-tempo). A análise pós-teste foi realizada com teste de Tukey. Os dados não paramétricos estão apresentados como mediana e percentil (25/75) e foram avaliados com teste de Friedman e pós-teste de Tukey. Para as análises, usou-se o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 10.0.

Foram estudados nove animais em cada grupo (SvO₂ e controle). Dois animais (um em cada grupo) morreram antes de completar as doze horas de tratamento, um por colapso cardiocirculatório e outro por choque refratário.

5.1 Resultados hemodinâmicos, respiratórios e metabólicos

Como esperado, após a indução da sepse houve significativa redução dos valores de pressão arterial média, da saturação venosa mista, do índice cardíaco e da pressão venosa central (Tabela 1; Figuras 2-5). O tratamento com fluidos, drogas vasoativas e antibióticos restabeleceu estes parâmetros. Observou-se que no grupo SvO₂ os parâmetros hemodinâmicos foram significativamente melhores quando comparados com o grupo controle (Figuras 2-6). O grupo SvO₂ caracterizou-se assim por maior saturação venosa central de oxigênio, índice cardíaco, oferta de oxigênio, pressão venosa central, índice sistólico, fração de ejeção do ventrículo direito, índice do trabalho sistólico do ventrículo esquerdo e diurese cumulativa (Figuras 3 a 6 e tabela 1). Como esperado, o balanço hídrico cumulativo foi significativamente maior no grupo SvO₂ durante a intervenção (figura 7). A figura 8 caracteriza a dosagem cumulativa de dobutamine e apenas um animal do grupo SvO₂ não recebeu dobutamina devido à taquicardia limitante. Noradrenalina foi utilizada em todo experimento exceto em um animal do grupo controle. A dose cumulativa de norepinefrina (Figura 9) e o tempo livre desta droga não foram diferentes entre os dois grupos (Figura 10).

A tabela 2 descreve as medidas respiratórias, metabólicas e hematimétricas dos dois grupos. Embora a necessidade de volume no grupo SvO₂ tenha sido maior, a relação PaO₂/FiO₂ foi semelhante entre os grupos. A sepse aumentou o número de leucócitos e reduziu a contagem plaquetária nos animais, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 1. Parâmetros Hemodinâmicos dos grupos durante o período de estudo

Parâmetro	Grupo	Basal	Choque	3 horas	6 horas	9 horas	12 horas	Valor P
Frequência cardíaca (bpm)	SvO ₂	126 ± 30	195 ± 36 [¶]	189 ± 21 [¶]	181 ± 24 [¶]	168 ± 22 [¶]	163 ± 28 [¶]	0.005 *
	Controle	113 ± 11	184 ± 35 [¶]	172 ± 38 [¶]	174 ± 40 [¶]	175 ± 36 [¶]	182 ± 40 [¶]	0.528 #
Índice Sistólico (mL/kg/min)	SvO ₂	1.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1 [¶]	0.9 ± 0.3 [¶]	1.0 ± 0.2 [¶]	1.0 ± 0.4 ^{¶&}	1.1 ± 0.3 ^{¶&}	<0.001 *
	Controle	1.5 ± 0.4	0.4 ± 0.1 [¶]	0.8 ± 0.3 [¶]	0.8 ± 0.3 [¶]	0.8 ± 0.3 [¶]	0.7 ± 0.1 [¶]	0.006 #
POAP (mm Hg)	SvO ₂	8.0 ± 4.0	3.0 ± 3.0 [¶]	7.0 ± 3.0	7.0 ± 3.0	8.0 ± 4.0 ^{&}	9.0 ± 6.0 ^{&}	0.001 *
	Controle	5.0 ± 4.0	3.0 ± 2.0	5.0 ± 2.0	5.0 ± 2.0	5.0 ± 2.0	5.0 ± 2.0	0.003 #
IRVS [dynes.s ⁻¹ .(cm ⁵) ⁻¹ .kg ⁻¹]	SvO ₂	30.8 ± 7.7	44.3 ± 1.1	22.5 ± 6.7	23.0 ± 8.7	25.3 ± 11.2	23.7 ± 15.1	0.003 *
	Controle	35.8 ± 11.7	41.4 ± 16.0	29.9 ± 8.0	29.7 ± 7.7	28.3 ± 7.9	25.5 ± 7.2	0.055 #
ITSVE [(mL.mmHg)/kg.bat]	SvO ₂	2.1 ± 0.5	0.3 ± 0.1 [¶]	0.9 ± 0.4 [¶]	1.0 ± 0.3 [¶]	1.0 ± 0.4 ^{¶&}	1.0 ± 0.3 ^{¶&}	<0.001 *
	Controle	2.1 ± 0.5	0.3 ± 0.1 [¶]	0.8 ± 0.3 [¶]	0.8 ± 0.4 [¶]	0.7 ± 0.2 [¶]	0.7 ± 0.2 [¶]	0.006 #
FEVD	SvO ₂	0.32 ± 0.04	0.13 ± 0.07 [¶]	0.26 ± 0.13	0.29 ± 0.15 ^{&}	0.28 ± 0.09 ^{&}	0.26 ± 0.06 ^{&}	0.001 *
	Controle	0.35 ± 0.09	0.08 ± 0.08 [¶]	0.19 ± 0.14	0.16 ± 0.19	0.07 ± 0.09	0.17 ± 0.16	< 0.001 #
VDF (mL/kg)	SvO ₂	4.9 ± 0.9	2.4 ± 1.6	2.7 ± 1.6	3.7 ± 0.5 ^{&}	2.9 ± 1.9	3.7 ± 1.8	0.060 *
	Controle	3.9 ± 2.0	1.6 ± 1.9	2.2 ± 2.2	1.7 ± 1.5	2.0 ± 1.0	2.0 ± 2.0	0.004 #
IRVP [dynes.s ⁻¹ .(cm ⁵) ⁻¹ .kg ⁻¹]	SvO ₂	5.2 ± 1.2	17.6 ± 3.4 [¶]	7.9 ± 3.0	8.4 ± 2.6	9.2 ± 3.6	7.7 ± 3.1 ^{&}	<0.001 *
	Controle	7.7 ± 2.7	18.6 ± 5.6 [¶]	10.0 ± 1.5	10.0 ± 2.8	10.3 ± 2.1	10.0 ± 3.7	0.001 #
ITSVD [(mL.mmHg)/kg.beat]	SvO ₂	0.34 ± 0.13	0.11 ± 0.04 [¶]	0.24 ± 0.13	0.31 ± 0.15	0.33 ± 0.20	0.33 ± 0.13	0.001 *
	Controle	0.39 ± 0.18	0.12 ± 0.06 [¶]	0.24 ± 0.15	0.21 ± 0.13	0.21 ± 0.10	0.22 ± 0.10	0.196 #
DO ₂ (mL/min)	SvO ₂	892 ± 140	477 ± 104 [¶]	-----	940 ± 259 ^{&}	-----	890 ± 274	<0.001 *
	Controle	802 ± 158	458 ± 143 [¶]	-----	690 ± 107	-----	645 ± 320	0.004 #
VO ₂ (mL/min)	SvO ₂	249 ± 49	242 ± 97	-----	255 ± 104	-----	256 ± 66	0.698 *
	Controle	229 ± 55	252 ± 51	-----	286 ± 66	-----	200 ± 56	0.649 #
Taxa Extração (%)	SvO ₂	28 ± 5	51 ± 16 [¶]	-----	28 ± 10 ^{&}	-----	31 ± 11 ^{&}	<0.001 *
	Controle	28 ± 3	57 ± 9 [¶]	-----	42 ± 9 [¶]	-----	39 ± 4 [¶]	0.004 #
BE (mEq/L)	SvO ₂	-1.4 ± 3.6	-3.0 ± 2.9	-3.9 ± 2.6	-2.7 ± 4.6	-0.1 ± 4.6	-1.3 ± 4.7	0.076 *
	Controle	-0.7 ± 3.5	-1.9 ± 4.2	-1.6 ± 6.1	-1.5 ± 5.5	0.0 ± 6.6	-1.9 ± 4.7	0.094 #
Lactato (mEq/L)	SvO ₂	1.8 ± 0.7	1.8 ± 0.7 ^{&}	3.0 ± 0.9	3.1 ± 1.4	2.3 ± 1.2	2.4 ± 0.7	0.075 *
	Controle	2.1 ± 1.6	2.4 ± 0.8	4.2 ± 2.7	3.1 ± 2.4	3.3 ± 2.1	3.1 ± 1.7	0.010 #
Diurese (mL/kg/h)	SvO ₂	3.4 ± 3.0	0.3 ± 0.3	4.6 ± 3.2	7.4 ± 6.0	5.8 ± 4.8	2.6 ± 1.5	0.142 *
	Controle	2.7 ± 2.2	0.7 ± 0.4	3.6 ± 3.1	2.4 ± 2.1	2.1 ± 2.0	1.4 ± 1.0	0.066 #

* ANOVA duas vias intra grupos, # ANOVA duas vias entre grupos. Não existe interação fator-tempo. ¶ P < 0.05 vs basal; Análise pós-teste de Tukey. & P < 0.05 vs controle; Análise pós-teste de Tukey.

POAP indica pressão de oclusão da artéria pulmonar; IRVS indica índice de Resistência vascular sistêmica; ITSVE indica índice do trabalho sistólico de ventrículo esquerdo; FEVD indica fração de ejeção de ventrículo direito; VDF indica volume diastólico final; IRVP indica índice de resistência vascular pulmonar; ITSVD indica índice de trabalho sistólico de ventrículo direito, DO₂ indica oferta de oxigênio; VO₂ indica consumo de oxigênio e SBE indica base excess.

Tabela 2. Parâmetros Respiratórios, Metabólicos e Hematológicos dos grupos durante o período de estudo

Parâmetro	Grupo	Basal	Choque	3 horas	6 horas	9 horas	12 horas	Valor P
PaO₂ (mm Hg)	SvO₂	100 ± 20	86 ± 21	94 ± 25	89 ± 22	84 ± 21	88 ± 24	0.469 *
	Controle	98 ± 20	82 ± 16	82 ± 23	91 ± 35	84 ± 26	89 ± 28	0.592 #
Relação P/F	SvO₂	348 ± 67	277 ± 53	139 ± 150 [¶]	221 ± 98 [¶]	167 ± 138 [¶]	240 ± 95	0.001 *
	Controle	368 ± 73	264 ± 126	147 ± 132 [¶]	235 ± 145 [¶]	149 ± 100 [¶]	239 ± 156	0.946 #
PaCO₂ (mm Hg)	SvO₂	39 ± 4	39 ± 3	39 ± 9	42 ± 9	43 ± 7	40 ± 6	0.279 *
	Controle	37 ± 8	35 ± 4	44 ± 14	40 ± 7	43 ± 9	40 ± 8	0.712
pH	SvO₂	7.39 ± 0.04	7.36 ± 0.05	7.36 ± 0.08	7.34 ± 0.08	7.38 ± 0.08	7.38 ± 0.08	0.351 *
	Controle	7.42 ± 0.08	7.42 ± 0.07	7.35 ± 0.10	7.38 ± 0.06	7.37 ± 0.08	7.37 ± 0.04	0.253 #
HCO₃⁻ (mEq/L)	SvO₂	21 ± 4	19 ± 4	20 ± 2	19 ± 4	20 ± 4	21 ± 4	0.839 *
	Controle	21 ± 6	19 ± 5	19 ± 5	20 ± 5	20 ± 7	21 ± 6	0.787 #
Hemoglobina (g/dL)	SvO₂	9.5 ± 0.9	13.6 ± 2.4 [¶]	-----	10.9 ± 1.5	-----	10.0 ± 1.5	0.007 *
	Controle	9.5 ± 1.6	13.5 ± 1.5 [¶]	-----	11.0 ± 0.8	-----	11.5 ± 0.8	0.872 #
Leucocitos (Cels/mm ³)	SvO₂	16414 ± 4073	-----	-----	-----	-----	18229 ± 8334	0.114 *
	Control	15289 ± 5976	-----	-----	-----	-----	24517 ± 11728	0.518 #
Plaquetas (Plat/mm ³)	SvO₂	317143 ± 72017	-----	-----	-----	-----	136714 ± 25263 [¶]	<0.001 *
	Controle	301889 ± 87146	-----	-----	-----	-----	154000 ± 44272 [¶]	0.786 #
Temperatura (° C)	SvO₂	36.7 ± 0.6	40.4 ± 1.1 [¶]	38.4 ± 1.7 [¶]	38.2 ± 1.3 [¶]	38.2 ± 1.2 [¶]	38.5 ± 1.1 [¶]	0.008 *
	Controle	36.8 ± 0.8	39.7 ± 1.4 [¶]	38.9 ± 1.1 [¶]	39.0 ± 1.1 [¶]	39.2 ± 1.0 [¶]	39.3 ± 1.2 [¶]	0.179 #

* ANOVA duas vias intra grupos, # ANOVA duas vias entre grupos. Não existe interação fator-tempo.

[¶] P < 0.05 vs basal; Análise pós-teste de Tukey.

Figura 2. Pressão Arterial Sistêmica Média de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p=0.309$, intra-grupos $p<0.001$ e interação fator-tempo $p=0.809$). As marcas cinza indicam todos os dados anotados. As marcas negras indicam os dados escolhidos previamente para serem analisados. * Análise pós-teste de Tukey, $p<0.05$ vs basal. § Análise pós-teste de Tukey, $p<0.05$ vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, $p<0.05$ vs grupo controle.

Figura 3. Saturação Venosa Mista de Oxigênio de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p < 0.001$, intra-grupos $p < 0.001$ e interação fator-tempo $P = 0.426$). As marcas cinza indicam todos os dados anotados. As marcas negras indicam os dados escolhidos previamente para serem analisados. * Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs basal. § Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs grupo controle.

Figura 4. Pressão Venosa Central de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p < 0.001$, intra-grupos $p < 0.001$ e interação fator-tempo $p = 0.232$). As marcas cinza indicam todos os dados anotados. As marcas negras indicam os dados escolhidos previamente para serem analisados. * Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs basal. § Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs grupo controle.

Figura 5. Índice Cardíaco de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p < 0.001$, intra-grupos $p < 0.001$ e interação fator-tempo $p = 0.335$). As marcas cinza indicam todos os dados anotados. As marcas negras indicam os dados escolhidos previamente para serem analisados. * Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs basal. § Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs grupo controle.

Figura 6. Diurese cumulativa de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p < 0.001$, intra-grupos $p < 0.001$ e interação fator-tempo $p = 0.374$). § Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs grupo controle.

Figura 7. Balanço Hídrico cumulativo de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p < 0.001$, intra-grupos $p < 0.001$ e interação fator-tempo $p = 0.041$). § Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs grupo controle.

Figura 8. Dosagem cumulativa de dobutamina durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p=0.003$, intra-grupos $p<0.001$ e interação fator-tempo $p=0.003$). * Análise pós-teste de Tukey, $p<0.05$ vs choque. # Análise pós-teste de Tukey, $p<0.05$ vs grupo controle.

Figura 9. Dosagem cumulativa de norepinefrina de ambos os grupos durante o estudo. (ANOVA duas vias entre grupos $p < 0.001$, intra-grupos $p < 0.001$ e interação fator-tempo $p = 0.751$). *Análise pós-teste de Tukey, $p < 0.05$ vs choque.

Figura 10. Tempo livre de norepinefrina e dobutamina durante as doze horas pós-choque em ambos os grupos. ‡ $p < 0.001$ vs grupo controle, teste T-Student.

5.2 Parâmetros inflamatórios

A interleucina 6 alcançou o pico de sua produção durante a fase de choque e declina após a ressuscitação volêmica em ambos os grupos, mantendo-se mais alta que o basal durante todo o tratamento (Figura 11). Já a interleucina 10 não aumenta de forma significativa após o choque e, ainda, não há nenhuma diferença entre os dois grupos quanto a esse parâmetro (Figura 12). Um aumento significativo nas concentrações séricas de nitrato após a sepse também foi observado, porém sem diferença significativa entre os grupos (Figura 13). A sepse induziu ainda uma importante diminuição na expressão de CD14 em neutrófilos em ambos os grupos, redução essa que não foi revertida com o tratamento e não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 14).

A análise do metabolismo oxidativo em neutrófilos de forma constitutiva e após estímulo com *S. aureus* e PMA demonstrou que durante o choque e a ressuscitação volêmica, a geração de espécies reativas foi similar ao basal, exceto por um aumento da geração no grupo SvO₂ após 12 horas de tratamento. Esses achados indicam a manutenção na capacidade dos neutrófilos em gerar oxidantes tanto na análise constitutiva quanto após estímulo (Figura 15). Por outro lado nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os dois grupos após as intervenções hemodinâmicas descritas neste estudo.

A sepse não induziu alterações significativas na apoptose de neutrófilos e linfócitos, tanto antes do tratamento quanto após a intervenção (Figuras 16 e 17).

Figura 11. Concentrações Plasmáticas de IL-6 em ambos os grupos. *Teste de Friedman $p=0,002$, pós-teste de Tukey, $p<0,05$ vs basal. #Teste de Friedman $p=0,005$, pós-teste de Tukey, $p<0,05$ vs basal.

Figura 12. Concentrações Plasmáticas de IL-10 em ambos os grupos. $p=NS$, teste de Friedman.

Figura 13. Concentrações Plasmáticas de nitrato em ambos os grupos. § Teste de Friedman $p=0,042$, pós-teste de Tukey, $p<0,05$ vs basal. ¶ Teste de Friedman $p=0,041$, pós-teste de Tukey, $p<0,05$ vs basal.

† ANOVA duas vias intra-grupos $p < 0.001$, análise pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ vs basal.

Figura 14. Expressão de CD14 em neutrófilos de ambos os grupos.

Figura 15. Metabolismo oxidativo em neutrófilos, de forma constitutiva e após incubação com *S. aureus* e PMA. § Teste de Friedman $p=0,006$, análise pós-teste de Tukey $p<0,05$ vs. choque (constitutiva).

Figura 16. Percentual de neutrófilos circulantes viáveis e apoptóticos em ambos os grupos durante o tratamento. $p=NS$, teste de Friedman.

Figura 17. Percentual de linfócitos circulantes viáveis e apoptóticos em ambos os grupos durante o tratamento. $p=NS$, teste de Friedman.

5.3 Estresse oxidativo cardiovascular

As figuras 18 a 21 mostram vários parâmetros referentes ao estresse oxidativo cardiovascular em ambos os grupos. Não houve nenhuma diferença entre as duas estratégias de tratamento em relação à atividade da NADP(H) oxidase nos vasos e no miocárdio, conteúdo de glutatona reduzida no miocárdio e nitrato no miocárdio. A marcação da imunohistoquímica para nitrotirosina no miocárdio e nos vasos também não teve diferença entre os dois grupos (amostra representativa - figuras 20 e 21).

Figura 18. Painel A. Produção de superóxido miocárdica em ambos os grupos. p=ns, teste-t Student. Painel B. Produção de superóxido vascular em ambos os grupos. p=ns, teste-t Student.

Figura 19. Painel A. Conteúdo de Glutathione miocárdica em ambos os grupos. $p=ns$, teste-t Student. Painel B. Concentração de nitrato miocárdica em ambos os grupos. $p=ns$, teste-t Student.

Figura 20. Imunohistoquímica para nitrotirosina em miocárdio de ambos os grupos (amostra representativa). Painel A. Grupo Controle. Painel B. Grupo SvO₂.

Figura 21.Imunohistoquímica para nitrotirosina em artéria carótida de ambos os grupos (amostra representativa). Painel A. Grupo Controle. Painel B. Grupo SvO₂.

Conforme protocolos mundialmente estabelecidos para tratamento da sepse grave e do choque séptico a ressuscitação volêmica é guiada pela saturação venosa central de oxigênio. Mas poucos são os estudos que foram desenhados para encontrar uma base fisiopatológica que sustentasse tal intervenção (DELLINGER et al, 2008).

No escopo deste estudo nós demonstramos que, em um modelo experimental de choque séptico por peritonite fecal, o tratamento com antibióticos e a ressuscitação hemodinâmica precoce com fluidos e drogas vasoativas guiada pela saturação venosa de oxigênio está associada com uma melhora no perfil hemodinâmico. Contudo, tal perfil hemodinâmico não associa-se a alterações significantes na modulação da resposta inflamatória ou no estresse oxidativo cardiovascular o que sugere que, se há um benefício fisiopatológico desta estratégia terapêutica, o mesmo pode decorrer de outros mecanismos.

As alterações hemodinâmicas e inflamatórias induzidas pela sepse no presente estudo foram marcantes. As alterações hemodinâmicas precoces que ocorrem em seres humanos têm sido relacionadas à hipovolemia inicial do quadro séptico. Esta hipovolemia é dependente da baixa ingesta oral durante o quadro que originou a sepse ou, até mesmo, pelo aumento das perdas orgânicas de água (perdas insensíveis por febre, diarreia, vômito, sudorese) (RIVERS et al, 2001, RIVERS et al, 2008)(RADY et al, 1996). Nesses pacientes a venodilatação e a perda de líquidos para o interstício devido ao aumento da permeabilidade capilar determinam grande déficit de pré-carga cardíaca, débito

cardíaco e queda na oferta tecidual de oxigênio (RIVERS et al, 2001, RIVERS et al, 2008) (RADY et al, 1996). Com a ressuscitação volêmica agressiva há melhora do débito cardíaco e diminuição da resistência vascular periférica, surgindo assim as características hemodinâmicas típicas de choque hiperdinâmico (RAMOS & AZEVEDO, 2010). Os achados hemodinâmicos da hipovolemia precoce foram demonstrados em nosso estudo pela taquicardia, hipotensão, oligúria e redução do débito cardíaco após a sepse. Outra característica marcante desse estudo foi a baixa oferta tecidual de oxigênio, grande necessidade de noradrenalina, grande necessidade de fluidos para ressuscitação hemodinâmica com o objetivo de manter a pressão arterial média nos valores alvo. Essas alterações hemodinâmicas significativas poderiam ser desencadeadas por significativo aumento de citocinas plasmáticas e aumento das concentrações de nitrato plasmático. Essa grave disfunção hemodinâmica foi corrigida com o tratamento, principalmente no grupo SvO₂, como demonstrado pelas diferenças no índice cardíaco, oferta tecidual de oxigênio e variáveis de contratilidade miocárdica e saturação venosa central entre os dois grupos. A ressuscitação volêmica mais agressiva e o uso de dobutamina no grupo grupo SvO₂ justificam tais melhorias na hemodinâmica do paciente. Os efeitos benéficos da dobutamina na função cardiovascular e intestinal e no fluxo sanguíneo microcirculatório são bem estabelecidos (NEVIERE et al, 2010)(CUNHA-GONCALVES et al, 2009).

Nossos achados são contrários a outros resultados da literatura que demonstraram uma redução nos biomarcadores da resposta inflamatória quando tratados com a terapia guiada por metas (RIVERS et al, 2007). A variação entre as espécies estudadas poderia ser uma justificativa para tal

resultado, pois uma adequada ressuscitação volêmica em humanos pode não ser adequada em suínos, mesmo esses sendo um modelo bastante difundido para estudos hemodinâmicos e respiratórios. Com o objetivo de diminuir tal variabilidade esse modelo animal foi desenhado para ser similar ao tratamento em humanos: tempo de início do tratamento somente após a hipotensão, uso de antibióticos, suporte hemodinâmico, terapia com fluidos, vasopressores, drogas inotrópicas guiadas por parâmetros de perfusão. A utilização de um modelo experimental nos permitiu aferir inúmeras variáveis clínicas e dados mecanísticos impraticáveis de serem realizados em pacientes. Contudo, existe uma dificuldade considerável para se extrapolar os dados de modelos experimentais para seres humanos.

Outra possível razão para ausência de diferença entre os dois grupos em nosso estudo é a grande diferença de volume recebido (COTTON et al, 2006). O grupo SvO₂ recebeu mais volume na forma de solução de Ringer Lactato que o grupo controle. Outros modelos experimentais demonstraram que apenas a infusão de grandes volumes de líquidos pode deflagrar a resposta inflamatória e o estresse oxidativo (SANTRY & ALAM, 2010)(BRANDT et al, 2009). Mais especificamente falando de sepse, um recente estudo mostrou que ressuscitação volêmica agressiva associa-se a piores desfechos. Em estudos clínicos de lesão pulmonar aguda, balanço hídrico positivo foi relacionado com maior tempo de permanência na UTI (THE NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE – ARDS CLINICAL TRIALS NETWORK, 2006). É possível que neste modelo experimental algum eventual benefício fisiopatológico da terapia guiada por metas poderia ter sido mascarado pela ressuscitação volêmica agressiva. Interessantemente, não

houve diferença entre os dois grupos na troca gasosa e nos parâmetros ventilatórios.

Atualmente há grande controvérsia sobre a real efetividade da terapia guiada pela saturação venosa de oxigênio (PEREL, 2008)(PUSKARICH et al, 2009). Outros estudos tem demonstrado que novas variáveis hemodinâmicas podem ser utilizadas, como a velocidade de clareamento do lactato (JONES et al, 2010).

Estudos prévios e em andamento tentaram reproduzir os resultados do estudo da EGDT, com objetivo inclusive de avaliar os mecanismos fisiopatológicos (PEAKE et al, 2009). Nosso estudo participa desta discussão sugerindo que a melhora na mortalidade dos pacientes tratados com a terapia guiada por metas não parece ser por modulação da resposta inflamatória ou do estresse oxidativo. Além disso, dois estudos clínicos não sinalizaram nenhuma mudança da cascata do complemento (YOUNGER et al, 2010) e nos biomarcadores da coagulação (TRZECIAK et al, 2010) num grupo de pacientes tratados com a terapia guiada pela saturação venosa de oxigênio. Em outro estudo clínico em pacientes submetidos a cirurgia abdominal que foram ressuscitados hemodinamicamente guiados pela saturação venosa de oxigênio, a estratégia utilizada foi volume e dopexamina. Tal estudo alcançou suas metas hemodinâmicas e de melhoria microcirculatória, mas falhou em demonstrar qualquer melhora no perfil inflamatório do paciente (JHANJI et al, 2010). Portanto o mecanismo fisiopatológico que justifica os resultados na mortalidade dos pacientes tratados com a terapia guiada por metas está parcialmente claro.

Após os resultados do estudo de EGDT, três estudos multicêntricos de grande porte foram idealizados em diferentes continentes, com o objetivo de confirmar os resultados do estudo de centro único da EGDT. Em março de 2014, o estudo PROCESS foi divulgado e, em seu resultado principal, não conseguiu identificar diferença significativa na mortalidade hospitalar de pacientes diagnosticados na sala de emergência e tratados com EGDT ou submetidos à terapia usual (YEALY et al, 2014). Assim, a controvérsia sobre o impacto da EGDT persiste. Aguardamos os resultados dos outros dois estudos, previstos para serem divulgados até o final de 2014.

A resposta inflamatória é o maior contribuinte para mortalidade e disfunções orgânicas secundárias a sepse. Neste estudo nós demonstramos que há uma importante redução na expressão celular de CD14, o qual faz parte da resposta inflamatória desencadeada por agentes infecciosos e pode sinalizar a apoptose celular (BRUNIALTI et al, 2006). Estudos prévios acharam uma resposta semelhante a nossa em relação à redução da expressão do CD14 em monócitos (HIKI et al, 1998).

O aumento da produção de óxido nítrico pelos vasos vista em nosso estudo também o foi em outros modelos (AZEVEDO et al, 2007). Do mesmo modo, dados experimentais sugerem aumento da produção de superóxido em vasos de suínos após a sepse (JAVESGHANI et al, 2003). Contudo, nossos dados não conseguiram demonstrar qualquer ação da estratégia terapêutica de otimização da SvO₂ no estresse oxidativo cardiovascular.

A similaridade do presente modelo com as situações clínicas habituais da sepse tratada nas salas de emergências e UTIs é um aspecto positivo do nosso estudo. Além disso, nós realizamos uma avaliação extremamente

abrangente da resposta inflamatória e do estresse oxidativo cardiovascular, com diversas mensurações realizadas com várias metodologias. Por outro lado, este estudo apresentou algumas limitações. Inicialmente, a amostra pequena e a heterogeneidade da doença (a despeito da padronização do inóculo e do tratamento) podem ter sido importantes, visto que poderiam limitar a identificação de significância estatística nos nossos dados, introduzindo a possibilidade de erro tipo II na análise. A sedação e entubação orotraqueal realizadas previamente à indução da sepse também diferem parcialmente do cenário clínico inicial. Isso pode explicar em parte porque os níveis de lactato não se elevaram inicialmente quando instalado o choque séptico acreditando-se que a demanda metabólica da musculatura ventilatória tem real importância na produção deste marcador.

7 Conclusão

Esse estudo conclui que num modelo de choque séptico com razoável semelhança em relação à doença clinicamente observada, um algoritmo de tratamento guiado por metas é capaz de melhorar o perfil hemodinâmico. Por outro lado, essa estratégia não induziu alterações no perfil inflamatório e no estresse oxidativo cardiovascular. O real benefício da terapia guiada por metas na fisiopatologia do choque séptico ainda deverá ser motivo de outros estudos.

1. AZEVEDO LC, PONTIERI V, TUCCI P, LAURINDO FR. Exosomes derived from plasma of septic patients induce myocardial dysfunction. *Critical Care*. 2004; 8(Suppl 1):P201.
2. AZEVEDO LC, JANISZEWSKI M, SORIANO FG, LAURINDO FR. Redox mechanisms of vascular cell dysfunction in sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006; 6(2):159Y-64Y.
3. AZEVEDO LC, PARK M, NORITOMI DT, MACIEL AT, BRUNIALTI MK, SALOMAO R. Characterization of an animal model of severe sepsis associated with respiratory dysfunction. *Clinics*. 2007; 62:491-8.
4. BESTEBROER J, POPPELIER MH, ULFMAN LH, LENTING PJ, DENIS CV, van KESSEL KP, et al. Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil Rolling. *Blood*. 2007; 109:2936-43.
5. BRANDES RP, KODDENBERG G, GWINNER W et al. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension*. 1999; 33:1243-9.
6. BRANDT S, REGUEIRA T, BRACHT H, PORTA F, DJAFARZADEH S, TAKALA H, GORRASI J, BOROTTO E, KREICI B, HILTEBRAND LB, et al. Effect of fluid resuscitation on mortality and organ function in experimental sepsis models. *Crit Care*. 2009; 13: R186.
7. BRUNIALTI MK, MARTINS PS, CARVALHO HB, MACHADO FR,

- BARBOSA LM, SALOMAO R. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis. *Shock*. 2006;25:351-7.
8. CARTWRIGHT N, McMASTER SK, SORRENTINO R, PAUL-CLARK M, SRISKANDAN S, RYFFEL B, et al. Elucidation of toll-like receptor and adapter protein signalling in vascular dysfunction induced by Gram-positive *Staphylococcus aureus* or Gram-negative *Escherichia coli*. *Shock*. 2007;27:40-7.
9. COTTON BA, GUY JS, MORRIS JA Jr, ABUMRAD NN. The cellular, metabolic and systemic consequences of aggressive fluid resuscitation strategies. *Shock*. 2006; 26: 115-21.
10. CUNHA-GONCALVES D, PEREZ-DE-SA V, LARSSON A, THORNE J, BLOMQUIST S. Inotropic support during experimental endotoxemic shock: part II. A comparison of levosimendan with dobutamine. *Anesth Analg*. 2009;109:1576-83.
11. DELLINGER RP, LEVY MM, CARLET JM, BION J, PARKER MM, JAESCHKE R, REINHART K, ANGUS DC, BRUN-BUISSON C, BEALE R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med*. 2008; 34:17-60.
12. FAULKNER L, ALTMANN DM, ELLMERICH S, HUHTANIEMI I, STAMP G, SRISKANDAN S. Sexual dimorphism in superantigen shock involves

- elevated $\text{TNF}\alpha$ and $\text{TNF}\alpha$ -induced hepatic apoptosis. *Am J Resp Crit Care Med.* 2007;176:473-82.
13. FINK MP, ABRAHAM E, VINCENT JL, KOCHANKE PM. Textbook of critical care. 5ª Edição. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
 14. HIKI N, BERGER D, PRIGL C, BOELKE E, WIDECK H, DEIDELMANN M, STAIB L, KAMINISHI M, OOHARA T, BEGER HG. Hiki N. Endotoxin binding and elimination by monocytes: secretion of soluble CD14 represents an inducible mechanism counteracting reduced expression of membrane CD14 in patients with sepsis and in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Infect Immun.* 1998; 66: 1135-41.
 15. HOTCHKISS RS, KARL IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003; 348:138-50.
 16. JANISZEWSKI M, DO CARMO AO, PEDRO MA, SILVA E, KNOBEL E, LAURINDO FR. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit Care Med.* 2004;32:818-25.
 17. JAVESGHANI D, HUSSAIN SN, SCHEIDEL J, QUINN MT, MAGDER SA. Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide-treated rats and pigs. *Shock.* 2003;19:486-93.
 18. JHANJI S, VIVIAN-SMITH A, LUCENA-AMARO S, WATSON D, HINDS CJ, PEARSE RM. Haemodynamic optimisation improves tissue microvascular flow and oxygenation after major surgery: a randomised

- controlled trial. *Crit Care*. 2010;14:R151.
19. JONES AE, SHAPIRO NI, TRZECIAK S, ARNOLD RC, CLAREMONT HA, KLINE JA. Lactate clearance vs central venous oxygen saturation as goals of early sepsis therapy: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2010;303:739-46.
 20. LEVY MM, DELLINGER RP, TOWNSEND SR, LINDE-ZWIRBLE WT, MARSHALL JC, BION J, SCHORR C, ARTIGAS A, RAMSAY G, BEALE R, PARKER MM, GERLACH H, REINHART K, SILVA E, HARVEY M, REGAN S, ANGUS DC. Surviving Sepsis Campaign. *Crit Care Med*. 2010;38:367-74.
 21. MOSHAGE H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol*. 1997;181:257-66.
 22. NEVIERE R, CHAGNON JL, VALLET B, LEBLEU N, MARECHAL X, MATHIEU D, WATTEL F, DUPUIS B. Dobutamine improves gastrointestinal mucosal blood flow in a porcine model of endotoxic shock. *Crit Care Med*. 1997;25:1371-7.
 23. PEAKE SL, BAILEY M, BELLOMO R, CAMERON PA, CROSS A, DELANEY A, FINFER S, HIGGINS A, JONES DA, MYBURGH JA, et al. ARISE Investigators, for the Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group: Australasian resuscitation of sepsis evaluation (ARISE): a multi-centre, prospective, inception cohort study. *Resuscitation*. 2009; 80:811-8.

24. PEREL A. Bench-to-bedside review: the initial hemodynamic resuscitation of the septic patient according to Surviving Sepsis Campaign guidelines, does one size fit all? *Crit Care*. 2008;12:223.
25. PUSKARICH MA, MARCHICK MR, KLINE JA, STEUERWALD MT, JONES AE. One year mortality of patients treated with an emergency department based early goal directed therapy protocol for severe sepsis and septic shock: a before and after study. *Crit Care*. 2009;13:R167.
26. QIN S, WANG H, YUAN R, KI H, OCHANI M, OCHANI K, et al. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med*. 2006; 203:1637-42.
27. RADY MY, RIVERS EP, NOWAK RM. Resuscitation of the critically ill in the ED: responses of blood pressure, heart rate, shock index, central venous oxygen saturation, and lactate. *Am J Emerg Med*. 1996;14:218-25.
28. RAHAL L, GARRIDO AG, CRUZ RJ Jr, SILVA E, POLI DE FIGUEIREDO LF. Fluid replacement with hypertonic or isotonic solutions guided by mixed venous oxygen saturation in experimental hypodynamic sepsis. *J Trauma*. 2009; 67:1205-12.
29. RAMOS FJ, AZEVEDO LC. Hemodynamic and perfusion endpoints for volemic resuscitation in sepsis. *Shock*. 2010; 34(Suppl 1):34-9.

30. RIVERS EP, BOBA V, VISBAL A, WHITMILL M, AMPONSAH D. Management of sepsis: early resuscitation. *Clin Chest Med*. 2008;29:689-704.
31. RIVERS EP, KRUSE JA, JACOLEN G, et al. The influence of early hemodynamic optimization on biomarker patterns of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2007;35:2016-24.
32. RIVERS EP, NGUYEN, HAVSTAD S, RESSLER J, MUZZIN A, KNOBLICH B, PETERSONE, TOMLANOVICH M. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001; 345:1368-77.
33. SANTRY HP, ALAM HB. Fluid resuscitation: past, present and the future. *Shock*. 2010; 33:229-41.
34. SPRONG T, PICKKERS P, GEURTS-MOESPOT A, van der VEN-JONGEKRIJG J, NEELEMAN C, KNAUP M, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in meningococcal septic shock and experimental human endotoxaemia. *Shock*. 2007; 27:482-7.
35. THE NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME (ARDS) CLINICAL TRIALS NETWORK. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2564Y-75Y.
36. TRZECIAK S, JONES AE, SHAPIRO NI, PUSATERI AE, ARNOLD RC, RIZZUTO M, ARORA T, PARRILLO JE, DELLINGER RP. A prospective

multicenter cohort study of the association between global tissue hypoxia and coagulation abnormalities during early sepsis resuscitation. *Crit Care Med.* 2010;38:1092-100.

37. YOUNGER JG, BRACHO DO, CHUNG-ESAKI HM, LEE M, RANA GK, SEN A, JONES AE. Complement activation in emergency department patients with severe sepsis. *Acad Emerg Med.* 2010;17:353-9.
38. YEALY DM, KELLUM JA, HUANG DT, BARNATO AE, WEISSFELD LA, PIKE F, TERNDROP T, WANG HE, HOU PC, LOVECCHIO F, FILBIN MR, SHAPIRO NI, ANGUS DC. A randomized trial of protocol-based care for early septic shock. PROCESS. *N Engl J Med.* 2014;370:1683-93.