

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MESTRADO EM CIRURGIA

ACÁCIA MARIA LOURENÇO FRANCISCO NASR

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DO FLUXO SANGUÍNEO
HEPÁTICO E RENAL APÓS REPOSIÇÃO VOLÊMICA NA
SEPSE ABDOMINAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

CURITIBA

2009

ACÁCIA MARIA LOURENÇO FRANCISCO NASR

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DO FLUXO SANGUÍNEO
HEPÁTICO E RENAL APÓS REPOSIÇÃO VOLÊMICA NA
SEPSE ABDOMINAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha

CURITIBA

2009

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

N264r
2009 Nasr, Acácia Maria Lourenço Francisco
Resposta inflamatória e do fluxo sanguíneo hepático e renal após reposição
volêmica na sepse abdominal em ratos / Acácia Maria Lourenço Francisco
Nasr ; orientador, Sérgio Luiz Rocha. – 2009.
xvi, 90 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2009
Bibliografia: f. 75-87

1. Cirurgia. 2. Septicemia. 3. Hipovolemia. 4. Peritonite. 5. Rato como
animal de laboratório. I. Rocha, Sérgio Luiz. II. Pontifícia Universidade Católica
do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. III. Título.

CDD 20. ed. – 610

Dedico este trabalho:

À Deus.

Aos meus pais, Acácio e Adélia, pelo exemplo de caráter dignidade e honestidade, fundamentais em minha formação pessoal e profissional.

Ao meu esposo Adonis, seu incentivo, companhia e carinho foram essenciais para conclusão desta dissertação.

Ao meu filho, querido e amado, Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam, foram solidárias e torceram por mim, e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr Sérgio Luiz Rocha, pela sábia orientação, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná por ter me recebido como aluna do Programa de Pós Graduação.

Ao Professor Aguinaldo José Nascimento, pela competência e sugestões na realização do estudo estatístico.

À Professora Rosana pelo auxílio na dosagem do TNF.

Aos Professores do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, Rosangela Locatelli Dittrich e José Francisco G. Warth, pelo apoio na realização do hemograma e cultura do líquido peritoneal.

Aos funcionários do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela cooperação na obtenção dos animais de experimentação.

Aos funcionários da disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Sr. Álvaro Roberto Gonçalves Machado e Sr. Misael Barbosa, por tornarem factível a realização deste trabalho, sendo prestativos, dedicados e competentes.

Aos acadêmicos, Thiago de Oliveira, Ana Carolina Trautwein, Ana Carolina Chociai e Geovana Gugelmin, que colaboraram na parte experimental desta pesquisa.

À minha sogra, D. Merce, pela atenção dedicada ao Gabriel, permitindo que eu estudasse com tranquilidade.

Aos meus irmãos, Lúcio e Pedro, que sempre me incentivaram na busca do conhecimento, sendo exemplos de competência, garra, determinação e disciplina.

*“O estudo, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é
consentido sermos crianças por toda a vida”.*

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: a sepse está associada à hipovolemia e redução da perfusão tecidual, e estas se não controladas, aumentam a morbimortalidade desta doença. Muitos estudos têm sido realizados, com a finalidade de avaliar o impacto da reposição volêmica precoce em restaurar a estabilidade hemodinâmica na sepse. **Objetivo:** avaliar o comportamento do TNF, do hemograma, das proteínas plasmáticas totais e do fluxo sanguíneo tecidual hepático e renal na sepse abdominal causado por ligadura e punção cecal em ratos tratada com solução de cloreto de sódio 0,9% ou solução de ringer lactato. **Método:** utilizaram-se 50 ratos Wistars, machos, adultos entre 100 e 120 dias de vida, divididos em quatro grupos: grupo 1: Ligadura e punção cecal (LPC) [n=12], grupo 2: LPC + solução salina de cloreto de sódio 0,9% [n=16], grupo 3: LPC + solução de ringer lactato [n=14] e grupo 4: Laparotomia [n=8]. A sepse foi induzida através da LPC e a reposição volêmica, nos grupos determinados, realizada após a LPC. Após seis horas de observação foi aferido o fluxo sanguíneo no fígado e no rim utilizando-se um fluxômetro a laser. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem laboratorial do hemograma, proteínas totais e TNF- α . **Resultados:** na avaliação do fluxo hepático os grupos apresentaram comportamento semelhante. Já o fluxo sanguíneo renal foi maior no grupo 4, grupo controle, em relação aos demais grupos. Na avaliação do hemograma não houve diferença significativa na hemoglobina, hematócrito, segmentados e linfócitos entre os grupos. No entanto o grupo 1 com LPC sem tratamento apresentou a menor contagem de leucócitos com diferença significativa em relação ao grupo 4. As proteínas totais foram menores nos grupos 2 e 3. Quanto ao TNF- α , a média geral foi de 61,08 pg/dL variando de 26,24 pg/dL no grupo 4 até 77,67 pg/dL no grupo 3. **Conclusões:** o aumento no TNF na LPC é inversamente proporcional ao número de leucócitos. Os leucócitos diminuem de forma significativa na LPC não tratada com reposição volêmica com solução cristalóide isotônica. A reposição volêmica ocasiona diminuição das proteínas plasmáticas totais por diluição. Não há alteração do fluxo sanguíneo hepático 6 horas após sepse abdominal causada por LPC, mesmo após reposição volêmica. Na sepse abdominal, 6 horas após LPC, ocorre queda significativa do fluxo sanguíneo renal, sendo que, o fluxo sanguíneo renal tem aumento significativo com a reposição volêmica com solução salina de cloreto de sódio 0,9%.

Descritores: Sepse. Fluxo sanguíneo renal. Citocinas. Modelos animais. Peritonite. Fluxometria por *laser* Doppler

ABSTRACT

Introduction: sepsis is associated to hypovolemia and reduced tissue perfusion, and if these are not controlled they increase the morbidity and mortality of this disease. Many studies have been conducted to evaluate the impact of early volemic replacement in restoring hemodynamic stability in sepsis. **Aim:** to evaluate the hepatic and renal tissue blood flow, the behavior of pro-inflammatory and hematological markers in sepsis treated with 0.9% sodium chloride solutions or Ringer's lactate. **Method:** fifty male adult Wistar rats were used, ranging in age from 100 to 120 days, divided into four groups 1: cecal ligation and puncture (CLP) (n=12), group 2: CLP + 0.9% sodium chloride saline solution (n=16), group 3: CLP + Ringer's lactate solution (n=14) and Group 4: Laparotomy (n=8). Sepsis was induced through CLP and volemic replacement, in the determined groups, carried out after the CLP. After six hours of observation, the blood flow in the liver and kidney was checked, using a laser flowmeter. Blood samples were collected for laboratory analysis of the hemogram, total proteins and TNF- α . **Results:** the evaluation of the hepatic blood flow showed similar results for all the groups. The renal blood flow was highest in Group 4, the control group, in comparison with the other groups. There was no significant difference in hemoglobin, hematocrit, segmented neutrophils and lymphocytes. Group 1 had the highest leukocyte count, which was significantly different from that of Group 4. The total proteins were lower in Groups 2 and 3. As for the TNF- α , the general average was 61.08 pg/dL, ranging from 26.24 pg/dL in group 4 to 77.67 pg/dL in Group 3. **Conclusion:** after CLP there is a significant drop in kidney blood flow, and this increases significantly after volemic replacement with 0.9% sodium chloride saline solution. Increased TNF in the CLP is inversely proportional to the number of leukocytes, and the leukocytes are significantly reduced in the untreated CLP.

Key words: Sepsis. Kidney blood flow. Cytokines. Animal models. Peritonitis. Laser Doppler flowmetry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Peso médio dos grupos 1,2 3 e 4 (em gramas).....	36
Tabela 2 -	Volume médio infundido nos grupos 2 e 3 (em ml).....	38
Tabela 3 -	Achados de inspeção de cavidade abdominal dos animais.....	39
Tabela 4 -	Fluxo hepático médio nos grupos 1,2,3 e 4 (em ml/min/100g).....	40
Tabela 5 -	Nível de significância (p) das diferenças do fluxo hepático médio entre os grupos 1,2,3, e 4, pelo teste de Tukey.....	41
Tabela 6 -	Fluxo renal médio nos grupos 1,2,3,e 4 (em ml/min/100g).....	42
Tabela 7 -	Nível de significância (p) das diferenças do fluxo renal médio por grupo, nos grupos 1, 2, 3 e 4, pelo teste de Tukey.....	43
Tabela 8 -	Nível de hemoglobina média (g/dl) nos grupos 1,2,3 e 4.....	45
Tabela 9	Nível do hematócrito médio (em %) nos grupos 1, 2, 3, e 4..	46
Tabela 10	Média da contagem de leucócitos (mil/mm ³) nos grupos 1,2,3 e 4.....	48
Tabela 11	Nível de significância (p) das diferenças de contagem de leucócitos entre os grupos 1, 2, 3 e 4, pelo teste de <i>Tukey</i>	49
Tabela 12	Média da contagem de neutrófilos segmentados (%) nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	49
Tabela 13	Média da contagem de linfócitos (%) nos grupos 1, 2, 3 e 4..	51
Tabela 14	Nível médio de proteínas totais (em g/dl) nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	52
Tabela 15	Nível de significância (p) das diferenças da dosagem de proteínas totais entre os grupos 1, 2, 3 e 4, pelo teste de Tukey.....	53
Tabela 16	Nível médio das dosagens de TNF- α (em pg/dl) nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos nos cortes corados pela Hematoxilina-eosina (HE).....	33
Quadro 2 - Caracterização da fase do processo inflamatório de acordo com escores final de cada grupo.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exposição do ceco no ponto onde será feita a LPC.....	26
Figura 2 -	Ceco após a ligadura	27
Figura 3 -	Punção do ceco.....	27
Figura 4 -	Momento da mensuração de fluxo hepático.....	29
Figura 5 -	Fluxograma cronológico do experimento.....	35
Figura 6 -	Médias dos pesos dos animais dos grupos 1,2,3 e 4.....	37
Figura 7 -	Médias do volume infundido nos animais dos grupos 2 e 3.....	38
Figura 8 -	Fluxo hepático médio nos grupos 1,2,3 e 4 (em ml/min/100g)..	41
Figura 9 -	Fluxo renal médio nos grupos 1,2,3 e 4 (em ml/min/100g).....	43
Figura 10 -	Gráfico de dispersão da correlação entre o fluxo renal e o fluxo hepático pela análise de covariância nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	44
Figura 11 -	Nível de hemoglobina média (g/dl) nos grupos 1,2,3 e 4.....	45
Figura 12 -	Nível do hematócrito médio (em %) nos grupos 1, 2, 3, e 4.....	47
Figura 13 -	Média da contagem de leucócitos (mil/mm ³) nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	48
Figura 14 -	Média da contagem de neutrófilos segmentados (%) nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	50
Figura 15 -	Média da contagem de linfócitos (%) nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	51
Figura 16 -	Nível médio de proteínas totais (em g/dl) nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	53
Figura 17 -	Nível médio das dosagens de TNF- α (em pg/dl) nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	55
Figura 18 -	Gráfico de dispersão da correlação entre TNF- α e leucócitos pela análise de covariância nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCP	American College of Chest Physicians
ATP	adenosina trifosfato
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
HCO ₃	Bicarbonato
HE	hematoxilina-eosina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IL-1	interleucina-1
KD	Quilodáltons
LPC	ligadura e punção cecal
LPS	Lipopolissacarídeos
NS	não significantes
PAM	pressão arterial média
PAS	<i>periodic acid-Schiff</i>
PIRO	<i>predisposing conditions, Infeccion, Response and Organ dysfunction</i>
PVC	pressão venosa central
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SDMO	síndrome de disfunção de múltiplos órgãos
SIRS	síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
UTI	unidades de terapia intensiva

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	3
2 LITERATURA.....	4
2.1 HISTÓRICO.....	4
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	5
2.3 CONCEITOS.....	5
2.4 FISIOPATOLOGIA.....	7
2.5 PERFUSÃO.....	8
2.6 FLUXO SANGUÍNEO.....	10
2.7 MANIFESTAÇÕES PULMONARES.....	11
2.8 MANIFESTAÇÕES RENAIS.....	12
2.9 MANIFESTAÇÕES HEPÁTICAS.....	13
2.10 MANIFESTAÇÕES HEMATOLÓGICAS.....	14
2.11 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	15
2.12 TNF- α	16
2.13 REPOSIÇÃO VOLÊMICA.....	18
3 MÉTODOS.....	25
3.1 MODELO DE ESTUDO.....	25
3.2 AMOSTRA.....	25
3.3 PREPARO DOS ANIMAIS E INDUÇÃO DA SEPSE ABDOMINAL.....	25
3.3.1 Procedimento Cirúrgico.....	26
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO.....	30
3.4.1 Grupo 1: LPC.....	30
3.4.2 Grupo 2: LPC e Reposição Volêmica com Solução Salina de Cloreto de Sódio 0,9%.....	30
3.4.3 Grupo 3: LPC e Reposição Volêmica com Solução de Ringer com Lactato.....	31
3.4.4 Grupo 4: Laparotomia.....	31

3.5 COLETA DE MATERIAL PARA DOSAGENS DE TNF- α E ANÁLISES SANGUÍNEAS.....	31
3.5.1 Hemograma e Proteínas Totais.....	32
3.5.2 TNF- α	32
3.6 HISTOPATOLOGIA.....	32
3.7 CULTURA DE LAVADO PERITONEAL.....	34
3.8 PROTOCOLO DE PESQUISA.....	34
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS.....	36
4.1 PESO.....	36
4.2 VOLUME INFUNDIDO.....	37
4.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA DA INSPEÇÃO DA CAVIDADE ABDOMINAL.....	38
4.4 CULTURA DO LÍQUIDO PERITONEAL.....	39
4.5 FLUXO HEPÁTICO.....	40
4.6 FLUXO RENAL.....	42
4.7 HEMOGRAMA.....	44
4.7.1 Hemoglobina.....	44
4.7.2 Hematócrito.....	46
4.7.3 Leucócitos.....	47
4.7.4 Neutrófilos Segmentados.....	49
4.7.5 Linfócitos.....	50
4.7.6 Proteínas Plasmáticas Totais.....	52
4.8 TNF- α	54
4.9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	56
5 DISCUSSÃO.....	57
5.1 MODELO DE ESTUDO.....	57
5.2 REPOSIÇÃO VOLÊMICA.....	60
5.3 PERFUSÃO TECIDUAL.....	62
5.4 HEMOGLOBINA.....	65
5.5 HEMATÓCRITO.....	66
5.6 LEUCÓCITOS.....	67
5.7 NEUTRÓFILOS.....	68

5.8 LINFÓCITOS.....	69
5.9 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS.....	69
5.10 TNF- α	70
5.11 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
6 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS.....	88

1 INTRODUÇÃO

Por quase um século, a sepse tem sido entendida como resposta do hospedeiro à infecção e, apesar de muitas subclassificações realizadas ao longo dos anos, houve pequena modificação nesta definição. Originalmente, acreditava-se que a sepse estava relacionada à presença de bactérias no sangue e os termos *sepse* e *septicemia* eram frequentemente usados como sinônimos. A idéia de que a sepse era causada por uma reação exagerada do paciente aos micro-organismos invasores foi parcialmente baseada na observação de que, em muitas ocasiões, não havia evidência clínica de infecção em pacientes com sintomas sépticos¹.

No Brasil, mais de 19% dos pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) apresentam sepse. A mortalidade global no curso dos pacientes sépticos chega a 46%, podendo atingir índices superiores a 65% nos casos de choque séptico. Estes pacientes também apresentam tempo de internação mais prolongado², envolvendo gastos elevados e crescentes no seu manejo e aumento substancial na mortalidade de pessoas idosas³.

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) tem como característica, desencadear o processo inflamatório em sítios distantes do processo inicial, independente da causa^{4,5}. Ela pode ser um processo auto-limitado⁴ ou, na presença de infecção, progredir para sepse⁵, sepse severa, choque séptico e, nos casos mais severos, pode culminar com a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO)⁴. A SRIS é mediada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) ou, simplesmente fator de necrose tumoral (TNF)⁷.

As manifestações clínicas da SRIS são as mesmas descritas para sepse⁴. Ambas ocorrem por estímulo excessivo de mediadores pró-inflamatórios ou da reação à resposta inflamatória sistêmica inflamatória a uma variedade de estímulos infecciosos e não infecciosos⁸. A sepse pode ser causada por organismos gram positivos, gram negativos, vírus e fungos que se proliferam no sítio da infecção e invadem a ou liberam substâncias na

corrente sanguínea que estimulam a liberação dos mediadores endógenos da sepse. Esses mediadores têm influência no coração, rins, pulmão, fígado, sistema nervoso central, sistema vascular e coagulação⁹.

Na fase inicial da sepse ocorre hipovolemia com frequência, em virtude da vasodilatação arterial e venosa e pela passagem de líquido para o espaço extravascular¹⁰. Nestes casos há choque distributivo, ou seja, a má distribuição do fluxo sanguíneo aos tecidos⁹.

A reposição volêmica adequada nessa fase inicial acarreta um quadro hiperdinâmico, com diminuição da resistência vascular sistêmica, débito cardíaco normal ou elevado e taquicardia. É necessária para garantir a adequada perfusão tecidual e a manutenção da função dos diferentes órgãos e sistemas¹⁰.

A reposição volêmica pode ser realizada com soluções cristalóides: soluções fisiológicas hipertônicas; isotônicas e de glicose, e com colóides: amido; gelatina; dextran e albumina. Considerando seu baixo custo e efeitos colaterais menos expressivos, as soluções cristalóides, podem ser utilizadas como primeira escolha para pacientes graves. As mais comumente utilizadas para a reposição volêmica são as soluções fisiológicas 0,9% e de Ringer com lactato¹¹.

Alterações hemodinâmicas, a desordem que se estende sobre a microcirculação e alterações celulares, se não revertidas levam ao desequilíbrio entre o fluxo sanguíneo e as necessidades metabólicas e estão envolvidas no desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos (DMO) e morte¹². Do ponto de vista histopatológico, mesmo em casos fatais de sepse e choque séptico, os achados incluem áreas focais de necrose e apoptose¹³.

O debate sobre os benefícios e os malefícios da resposta do hospedeiro à infecção, persiste até hoje. A idéia de sepse como uma resposta pró-inflamatória descontrolada ganhou suporte com a identificação de citocinas pró-inflamatórias na década de 1980¹⁴. As citocinas pró-inflamatórias, entre elas o TNF- α , desempenham papéis importantes no desenvolvimento de SIRS e da sepse, interferindo no prognóstico, na evolução e na intensidade do dano tecidual⁸.

O TNF- α (caquexina) é um polipeptídeo derivado de macrófagos a partir da clivagem da proteína de membrana com peso molecular de 17 quilo-

Dáltons (kD) pela enzima TNF convertase. É considerado um mediador pró-inflamatório por estimular a elaboração e a liberação de outras citocinas, além de estimular a resposta hepática na fase aguda. Quando infundido em animais saudáveis, causa alterações hemodinâmicas, dano orgânico semelhante ao encontrado em animais com sepse por organismos gram negativos. Produzido em grande quantidade por macrófagos ativados por endotoxina, tem sido associado como mediador no efeito letal da endotoxina¹⁵.

As concentrações TNF- α podem estar aumentadas em sepse clínica e experimental, tanto em infecções por organismos gram negativos, como por gram positivos, independente de cultura documentando infecção¹⁶. Um modelo de peritonite experimental em coelhos mostrou produção de TNF- α minutos após a injeção de lipopolissacarídeos, com pico de concentração no plasma entre 90 e 120 minutos¹⁷. O pico plasmático do TNF- α não está relacionado com o curso clínico ou a severidade do choque¹⁸.

Os níveis de TNF- α diminuem após o estímulo inicial. A persistência de níveis elevados de TNF- α em pacientes gravemente doentes está associada à mortalidade e está relacionada a: severidade do choque inicial, duração da falência orgânica, síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, pré-existência de falência hepática, presença de sepse de etiologia desconhecida. Além disso, sugere outros fatores como intensidade da resposta, inibição dos monócitos e captação das citocinas pela periferia¹⁸.

Há muito, a comunidade científica investiga sobre o tratamento da sepse e formas de melhorar sua evolução. A presente pesquisa foi realizada com o propósito de avaliar parte do componente inflamatório e o fluxo sanguíneo em resposta a reposição volêmica na sepse.

1.1 OBJETIVO

Avaliar o comportamento do TNF, do hemograma, das proteínas plasmáticas totais e do fluxo sanguíneo tecidual hepático e renal na sepse abdominal causado por ligadura e punção cecal em ratos tratada com solução de cloreto de sódio 0,9% ou solução de ringer lactato.

2 LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Na Grécia antiga, Hipócrates usava o termo *Pepse* para designar o processo de fermentação do vinho e de digestão da comida e o termo *Sepse*, para descrever casos de putrefação, sugerindo *cheiro ruim*. Esses termos representavam a quebra do equilíbrio biológico e poderiam ocorrer no organismo, sendo que *pepse* indicava boa saúde, enquanto *seps* estava relacionada à doença e morte¹⁹.

Aristóteles, e mais tarde os romanos, acreditavam que *seps* resultava da produção de germes que emitiam odor podre. A teoria da geração espontânea, na qual pequenas criaturas originavam-se espontaneamente do solo, de plantas e de outros animais, persistiu por séculos e originou a criação de medidas na saúde pública romana para eliminação destes germes¹⁹.

Em meados do século XVII, Francesco Redi realizou um experimento que abalou a teoria da geração espontânea. Este experimento era simples e fácil de reproduzir: carne era colocada numa jarra coberta por gaze; atraídas pelo odor da carne, as moscas punham ovos sobre a gaze e, destes, emergiam larvas. Com isso, Redi provou que as larvas não se originavam espontaneamente da carne pútrida²⁰. Com o tempo, *seps* perdeu a conotação de podridão e tornou-se uma condição clínica resultante de infecção, originando o conceito moderno de *seps* *apud* Davaine, 1889²¹.

Em 1892, Osler já definia *seps*, as condições associadas e a dificuldade no manejo. Escreveu que a consequência da *seps* era dependente da dose do veneno e da probabilidade do foco de infecção ser eliminado. Osler considerou que a inibição do eixo pró-inflamatório deve desfazer o equilíbrio do efeito imunossupressor do eixo anti-inflamatório e deve causar danos ao hospedeiro²¹.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A sepse permanece como capital causa de morbimortalidade em pacientes operados e vítimas de trauma, principalmente pela falência de múltiplos órgãos. Acomete 751.000 pessoas anualmente, sendo que destas, 215.000 morrem por ano, nos Estados Unidos, contribuindo para um custo anual de 16,7 bilhões de dólares³.

Estudos epidemiológicos mostram que a incidência de sepse na população mundial está aumentando em média, entre 1,5% e 8% ao ano, apesar do desenvolvimento técnico das UTIs e da melhora no tratamento de suporte¹. É mais frequente em homens e negros. Entre os micro-organismos causadores de sepse, houve um aumento desta causada por fungos e desde 1987 as bactérias gram positivas se tornaram o micro-organismo predominante²².

Índices elevados de mortalidade estão associados a fatores do hospedeiro, como o aumento do uso de terapia citotóxica e imunossupressora, idade da população, aumento da frequência de infecções por patógenos antibiótico-resistentes, doenças crônicas e uso de terapia invasiva para diagnóstico, tratamento e monitorização³.

2.3 CONCEITOS

Em 1991, foi realizada a Conferência de Consenso, promovida pelo *American College of Chest Physicians* (ACCP) em associação com a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM), onde foi introduzido o termo SRIS e definidos os conceitos de sepse, sepse severa, choque séptico e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos⁵.

O termo “Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica” (SRIS) foi proposto para descrever a reação inflamatória desencadeada pelo organismo, frente a qualquer agressão infecciosa ou não infecciosa⁵.

“Infecção” é um fenômeno microbiano, caracterizado por resposta inflamatória à presença de micro-organismos ou a invasão dos tecidos normalmente estéreis⁵.

“Bacteremia” é a presença de bactérias viáveis no sangue⁵.

“Sepse” é a resposta inflamatória sistêmica do organismo frente ao estímulo infeccioso e inclui a presença de dois ou mais dos seguintes critérios clínicos: temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; frequência cardíaca > 90 batimentos/minuto; taquipnéia, frequência respiratória > 20 movimentos/minuto ou hiperventilação, $\text{pCO}_2 < 32$ mmHg; alteração na contagem de células brancas sendo maior que 12.000 células/ mm^3 ou menor que 4.000 células/ mm^3 , ou presença de mais que 10% de neutrófilos imaturos⁵.

“Sepse grave” significa sepse associada a disfunção orgânica, hipotensão ou hipoperfusão. Perfusão anormal inclui acidose láctica, oligúria ou alteração aguda do estado mental. “Hipotensão induzida por sepse” é a presença de pressão arterial sistólica < 90 mmHg ou a redução de 40 mmHg ou mais, da pressão arterial sistólica de base, na presença de hipotensão de causa infecciosa⁵.

“Choque séptico” é caracterizado por sepse com hipotensão arterial persistente, mesmo após reposição volêmica adequada, associado a redução da perfusão, acidose láctica, oligúria e alteração do estado mental. Pacientes recebendo drogas inotrópicas ou vasopressoras podem estar normotensos e com perfusão diminuída, o que não exclui este estado⁵.

“Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas” se refere à presença de função orgânica alterada, em pacientes gravemente doentes, na qual a homeostase não pode ser mantida sem intervenção^{5,8,4}. Infecção oculta é a causa mais importante desta síndrome. Esta pode se desenvolver de duas formas: como resultado direto do dano ao organismo ou como consequência da resposta do hospedeiro ao dano inicial, desencadeando ativação da resposta inflamatória⁵.

Em 2001, foi realizada Conferência de revisão, em que ficou estabelecido que os critérios diagnósticos de SRIS são muito sensíveis e inespecíficos, embora seu conceito permaneça útil. Além disso, foi desenvolvido um sistema de estadiamento de sepse denominado PIRO (*Predisposing conditions, Infeccion, Response and Organ dysfunction*, para caracterizar melhor a síndrome com base nos fatores predisponentes, comorbidades associadas, natureza da infecção, características da resposta do hospedeiro e extensão da falência orgânica²³.

2.4 FISIOPATOLOGIA

Sepse ocorre quando uma infecção localizada precipita uma reação que desencadeia sintomas sistêmicos, como febre ou hipotermia, taquicardia, taquipnéia, e leucocitose ou leucopenia. A reação inflamatória é mediada por citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral- α , interleucinas e prostaglandinas, dos neutrófilos e macrófagos. As citocinas ativam a cascata da coagulação extrínseca e inibem a fibrinólise. Essa superposição de processos resulta em trombose microvascular, que é um fator potencial em produzir disfunção orgânica. A ativação do sistema de coagulação causa o consumo de anticoagulantes endógenos, como a proteína C e a antitrombina, isso é um fator importante no desenvolvimento da coagulação microvascular. Os mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios têm uma função importante na seps e o excesso deles resulta em mau prognóstico para o paciente²⁴.

A resposta ao trauma pode ser dividida em fases de reanimação e de restabelecimento. As alterações metabólicas na fase de reanimação, são bem entendidas como um arco reflexo do sistema nervoso periférico e do sistema imune por meio das citocinas como efetores aferentes, o sistema nervoso central como coordenador e os hormônios contra-regulatórios como efetores eferentes. Esses efetores, junto com as alterações na oxigenação dos tecidos, a produção de radicais livres, a produção de citocinas e outros mediadores, desencadeiam as profundas mudanças que ocorrem na fase de restabelecimento. As citocinas produzidas pelo trauma são capazes de estimular atividade neuro-endócrina, produção de proteína de fase aguda, anorexia, febre e catabolismo protéico. Esses efeitos são mediados pelo hipotálamo²⁵.

A heterogeneidade dos pacientes portadores de seps e dificulta os estudos clínicos³¹, fazendo com que as teorias de que a morte por seps e ocorre pelo hiperestímulo do sistema imune, sejam baseadas em estudos experimentais²⁷.

A evolução da seps e é caracterizada por um estado de imunodepressão. Neste estado, ocorre perda de linfócitos B, linfócitos T, CD4 e células dendríticas, além da diminuição na produção de anticorpos, na ativação dos macrófagos e na apresentação de antígenos^{28, 29}.

2.5 PERFUSÃO

O oxigênio é captado na atmosfera, difunde-se do espaço alveolar para o sangue capilar, onde é transportado ligado à hemoglobina e uma pequena parte dissolvido no plasma. Então, o débito cardíaco é distribuído na circulação sistêmica e posteriormente, distribuído na microcirculação. Finalmente, o oxigênio é liberado da hemoglobina e se difunde do espaço intravascular para o espaço intracelular, onde é utilizado para as funções vitais a nível celular. Na sepse existe alteração na oferta de oxigênio aos tecidos³⁰.

Sepse é um processo fisiopatológico, associado à anormalidades na utilização do oxigênio pelos tecidos e que leva a uma lesão tissular com falência de múltiplos órgãos. Ela altera a capacidade do hospedeiro de controlar a microcirculação, mesmo no parênquima de órgãos distantes do sítio de infecção³¹.

Lam et al., em 2004, desenvolveram um modelo de sepse normotensa para avaliar a habilidade da microcirculação em regular o fluxo regional de hemácias³¹. Encontrou redução da densidade de hemácias nos capilares perfundidos, aumento da heterogeneidade da forma dos capilares perfundidos com hemácias, aumento na proporção da largura dos capilares perfundidos com hemácias, aumento da velocidade média das hemácias nos capilares e redução do pico funcional da resposta hiperêmica. Também encontrou aumento na obstrução de capilares, que pode ser explicado por uma série de mecanismos potenciais: lesão da célula endotelial capilar e edema resultando na redução do diâmetro capilar, redução da fluidez das hemácias resultante do aumento da viscosidade sanguínea, aumento da migração dos leucócitos para os capilares e aumento da adesividade dos leucócitos nas vênulas pós-capilares. A redução total de capilares é provavelmente, pelo aumento no número de capilares não perfundidos, o que contribui para um menor aproveitamento de oxigênio nos tecidos sendo responsável pela hipoxia microrregional e lesão celular encontrada na falência de múltiplos órgãos.

A sepse é considerada a causa mais comum de choque vasoplégico. A importância clínica deste tipo de choque, está no fato dele ser o final comum

do choque severo de qualquer origem. Caracteriza-se por hipotensão, devido a vasodilatação periférica pela falha de contração da musculatura lisa, impedindo a adequada perfusão tecidual e sendo pobre à resposta à terapia com drogas vasopressoras. A pouca responsividade ocorre por ativação dos canais de potássio adenosina trifosfato (ATP) sensíveis, por um aumento na produção de óxido nítrico, o qual associado à acidose metabólica, impede a entrada celular de noradrenalina e angiotensina-II, mantendo a vasodilatação e hipotensão, apesar da alta concentração plasmática destes hormônios. Na fase inicial da sepse, observa-se aumento acentuado da vasopressina, que mantém a pressão arterial mediante a retenção hídrica nos túbulos coletores renais. Este aumento, porém, não é mantido nas fases subsequentes ³².

A microcirculação é acometida precocemente na sepse sofrendo os efeitos da hipoperfusão e da ação de micro-organismos. A diminuição do fluxo sanguíneo capilar leva à diminuição da passagem de eritrócitos e neutrófilos por diminuição da pressão de perfusão. Esse defeito ocorre, em parte, por diminuição da deformabilidade das células vermelhas e brancas, constrição arteriolar, circulação de fragmentos obstrutivos e *shunts* na microcirculação. Outros fatores são: a aderência de células epiteliais às paredes dos vasos, aumentando a resistência ao fluxo; o aumento da permeabilidade capilar e a ausência de controle neuro-humoral dos segmentos dos pequenos vasos da circulação. Durante a sepse e o choque séptico, as células endoteliais regulam o tônus vascular, controlam o fluxo sanguíneo local, influenciam a distribuição de líquidos e proteínas plasmáticas nos tecidos e modulam a ativação e a distribuição das células brancas aos tecidos³³. Em razão da estase vascular capilar prolongada, do fluxo deficiente e dos fatores liberados pelas células lesadas, a microcirculação se torna um meio propício para a proliferação bacteriana, sustentada por hipoxemia, acidose e toxemia. Estes eventos contribuem para a perda da integridade celular normal e a morte do hospedeiro³³.

Na sepse ocorre trombose microvascular, e esta, provavelmente, é uma resposta adaptativa que previne a propagação bacteriana dos tecidos para a circulação sistêmica, através dos capilares. Enquanto isso, os leucócitos removem as bactérias e reparam o dano tecidual. Contudo,

quando este processo se torna extenso, leva à isquemia tecidual, contribuindo para a falência de múltiplos órgãos e a morte³⁴.

Na análise histológica, o pulmão, rim e fígado são os órgãos mais frequentemente acometidos³⁴ e apesar da alteração na perfusão e oxigenação tecidual levar a morte celular por apoptose e/ou necrose, estudos em autópsia demonstram discordância entre os achados histológicos e o grau de disfunção orgânica em pacientes que morreram por sepse. A quantidade de células renais, hepáticas e pulmonares mortas, não têm relação direta com a disfunção orgânica³⁵.

2.6 FLUXO SANGUÍNEO

Quando uma radiação é refletida por superfícies em movimento, ela sofre uma alteração em frequência proporcional a velocidade do alvo. Estas alterações de frequência, observadas em ondas acústicas por Christian Johann Doppler, em 1842, foram denominadas efeito *Doppler*. Baseada nestes princípios, foi desenvolvida a fluxometria *laser Doppler*, que permite medir de forma não invasiva, variações de parâmetros hemodinâmicos da microcirculação³⁶.

A vantagem da fluxometria a laser é a de obter informações muito mais precisas sobre a perfusão, do que aquelas obtidas através de microscopia³¹, monitorizando o efeito do exercício, de drogas, de tratamentos e de manipulações no ambiente físico, tendo como alvo o leito vascular. A monitorização é transoperatória, feita continuamente na superfície do órgão com um probe de agulha³⁷.

O fluxo sanguíneo local no fígado e no rim, pode ser avaliado por meio do sistema de fluxometria a *laser Doppler*, baseado nos valores do efeito da luz de baixa potência (2 milliwatts) de um laser de diodo em estado sólido, operando com luz monocromática, com comprimento de onda 780 nm, acoplado à uma fibra óptica que entrega à radiação *laser*, a região a ser estudada. A geometria da sonda fornece a medida do volume de 0,7 a 1 mm³ de tecido. A radiação emitida pelo fluxômetro, ao atingir tecidos biológicos é espalhada pelas estruturas estáticas e móveis, a radiação espalhada pelas células sanguíneas em movimento, majoritariamente pelas hemácias, sofre

um desvio em frequência de acordo com os princípios do efeito *Doppler*. Uma parcela da radiação espelhada é captada por outra fibra óptica próxima à emissora, que conduz a radiação retro-espelhada à um fotodiodo que converte a radiação em sinais elétricos. O sinal elétrico, denominado sinal *Doppler*, é processado para a extração de informações sobre o fluxo sanguíneo³⁸.

Hiltebrand et al., em um estudo com animais de experimentação sépticos, avaliando a dinâmica do fluxo sanguíneo local no fígado e no rim, observaram diminuição de 49% e 44% respectivamente, do fluxo sanguíneo³⁸. Após reposição volêmica o fluxo sanguíneo no rim voltou aos valores de base, enquanto o fluxo sanguíneo no fígado ficou 34% abaixo dos valores de base.

2.7 MANIFESTAÇÕES PULMONARES

Alterações pulmonares, após o choque e sepse, são descritas clinicamente como choque pulmonar ou síndrome da angústia respiratória no adulto e podem cursar com hipoxemia³⁹. Estas alterações na sepse estão associadas à alteração do endotélio pulmonar, pela ativação da cascata inflamatória. Há acúmulo de líquido rico em proteínas no interstício pulmonar, acarretando progressivo desequilíbrio entre a ventilação e a perfusão pulmonar, *shunt* intrapulmonar, hipoxemia refratária, diminuição da complacência e necessidade de ventilação mecânica⁴⁰.

O choque pulmonar pode ser precipitado pelo aumento do TNF- α na circulação sistêmica. É caracterizado por aumento da permeabilidade vascular, sequestro de neutrófilos pulmonares, diminuição do ATP tecidual pulmonar e quebra das células alveolares endoteliais^{15,41}.

A reposição volêmica diminui a hipoxia e permite que parte do volume vá para o interstício, diminuindo a capacidade do pulmão de expelir bactérias, causando falência e choque pulmonar. Grande infusão de volume leva ao aumento transitório de líquido no pulmão, causando alteração da função respiratória e necessidade de terapia ventilatória com maior frequência. O edema pulmonar diminui a condição do pulmão de suportar o insulto bacteriano. A infecção produz alteração na função pulmonar, demonstrada

pelo edema, comprovado por aumento do peso pulmonar, hipoxia, diminuição da complacência e destruição hemorrágica do tecido pulmonar⁴².

Tracey et al., em um estudo experimental ao analisar a necropsia de ratos submetidos à caquexina, constataram inflamação e hemorragia na análise histopatológica pulmonar, evidenciando acentuada marginação neutrofílica, pneumonite e trombose arterial com migração de neutrófilos, características do dano pulmonar¹⁵.

O pulmão no exame anatomopatológico pós-sepse, apresenta congestão, edema intersticial e intra-alveolar, inflamação e depósito de fibrina. A parede alveolar torna-se revestida por membranas hialinas que consiste em um edema fluído, rico em fibrina, misturado com lipídios e citoplasma, remanescentes de células epiteliais necróticas⁴³. Na análise histológica de pulmão de ratos sépticos, Law, em 2000, encontrou na membrana alveolar com espessura normal, muitos leucócitos, incluindo neutrófilos e macrófagos intravascular pulmonar, aderidos ao endotélio vascular com poucas células vermelhas remanescentes. Estes achados são consistentes com ativação sistêmica de leucócitos, com sequestro de locais distantes da infecção. Os leucócitos ativados e aderidos impedem a remoção de hemácias⁴⁴.

2.8 MANIFESTAÇÕES RENAIS

A sepse e o choque séptico são fatores de risco importantes para o desenvolvimento da falência renal aguda, cuja patogênese é pouco compreendida e grande parte do conhecimento provém de estudos com animais⁴⁵. Na sepse, ocorre ativação de mecanismos compensatórios vasoconstritores e vasodilatadores no rim e o seu equilíbrio determina a hemodinâmica renal frequentemente com hipoperfusão^{45,46}

Mesmo com a condição hemodinâmica sistêmica relativamente normal, as endotoxinas podem causar a constrição das arteríolas renais e deste modo, reduzir a perfusão e função renal³⁵. Contudo, mesmo quando o fluxo sanguíneo renal é adequado, a redistribuição do fluxo favorece a região justa-medular com prejuízo para o fluxo cortical³⁵. Este fator, associado a produtos tóxicos liberados por interação neutrófilos-endotélio, dano

endotelial, alteração da perfusão e trombose microvascular, contribui para disfunção renal^{45,46}.

A acidose metabólica causa diminuição do fluxo sanguíneo renal e da velocidade de filtração glomerular⁴⁷. E, os ratos quando submetidos a infusão de TNF- α , apresentam necrose tubular aguda¹⁵.

No rim, as alterações encontradas na avaliação anatomopatológica durante a sepse, são referidas como necrose tubular aguda e se caracterizam por necrose epitelial tubular em múltiplos pontos ao longo do néfron, com grandes áreas não afetadas de permeio, frequentemente acompanhada por ruptura de membranas basais e oclusão de lumens glomerulares por cilindros. Outros achados são o edema intersticial e acúmulos de leucócitos em vasos retos dilatados⁴⁸.

2.9 MANIFESTAÇÕES HEPÁTICAS

Na sepse, o fígado tem uma grande importância na defesa do hospedeiro, devido ao fato de seu suprimento sanguíneo ser responsável por 25% do débito cardíaco. Além disso, a heterogeneidade celular do fígado, composta por hepatócitos, células de *Kupffer* e células sinusoidais epiteliais, está envolvida na resposta imune, anti-infecciosa e metabólica do organismo⁴⁹.

As células de *Kupffer* produzem cerca de 70% dos macrófagos do organismo, sendo a primeira defesa contra bacteremia portal e endotoxemia. São responsáveis por eliminação de bactérias, inativação de produtos bacterianos, produção de mediadores inflamatórios, como o TNF- α e remoção dos mesmos⁴⁹.

Os hepatócitos, mediante os receptores de citocinas pró-inflamatórias, modificam sua via metabólica por gluconeogênese, captação de aminoácidos, aumento da síntese de fatores de coagulação e complemento, assim como, inibição de protease⁴⁹.

Em adição, neutrófilos ativados recrutados produzem enzimas destrutivas e radicais derivados do oxigênio, que aumentam o dano hepático. Isto causa distúrbios na microcirculação, depósitos de fibrina, dano ao hepatócito, aumento de bactéria, endotoxemia e falência de múltiplos órgãos.

Alterações graves na função hepática, frequentemente são observadas no choque e na hipoperfusão hepática⁴⁹.

A redução da perfusão é um dos eventos mais importantes na disfunção hepática na sepse. Embora a mensuração do fluxo hepatoportal seja difícil em humanos, há muitos relatos experimentais em animais. Quando o débito cardíaco fica comprometido, cai também o fluxo hepático, seja pela redução de fluxo de artéria hepática diretamente, seja pela redução de fluxo portal secundária à vasoconstrição da artéria mesentérica, observada no choque séptico⁵⁰. Normalmente, a endotoxemia causa redução grave do fluxo sanguíneo no fígado, sendo acompanhado de hipóxia hepática, intumescimento endotelial, sequestro de leucócitos e liberação de citocinas³⁸.

2.10 MANIFESTAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Além da leucocitose com desvio à esquerda, ou da leucopenia, há outras manifestações hematológicas possíveis na sepse⁵⁰.

As sequelas de sepse incluem a anemia, que presumidamente resulta da diminuição do tempo de sobrevivência das hemácias⁵¹, da hemodiluição e da contração esplênica durante o dano séptico que também pode contribuir para alterações nos níveis de hemoglobina⁵².

Na sepse ocorre diminuição da capacidade de alteração na forma do eritrócito, com a ocorrência de alterações hemodinâmicas pelo aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, principalmente na microcirculação, contribuindo para alteração na perfusão. Ações mediadas pelo organismo séptico ou por leucócitos, devem ser responsáveis por estas alterações⁵⁰. Em um estudo experimental, Baskurt et al., encontraram leucopenia e aumento do hematócrito e da hemoglobina em todos os grupos, provavelmente por hemoconcentração⁵⁰.

Ebong et al., na análise sanguínea de ratos submetidos a um modelo animal de sepse não letal, induzida por ligadura e punção cecal (LPC), constataram diminuição de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, linfócitos ($5,1 \pm 0,4 \times 10^3$), monócitos e neutrófilos ($2,3 \pm 0,2 \times 10^3$)⁵³. O TNF- α plasmático foi baixo (< 70 pg/mL), ou seja, esteve presente em baixas

concentrações (29 ± 9 pg/mL). Relataram que o pico do TNF- α deve ter ocorrido antes da mensuração⁵³.

Outro estudo experimental em ratos pós LPC, mostrou leucocitose, aumento do número de neutrófilos, diminuição de linfócitos e eosinófilos⁵⁴. A trombocitopenia é frequente na sepse e pode ocorrer por um consumo periférico aumentado, por produção diminuída pela medula óssea ou por sequestro esplênico. A ativação plaquetária pode estimular a cascata da coagulação e inflamatória⁵⁵. A coagulação intravascular disseminada, complicação frequente da sepse, pode ocorrer e é caracterizada pela ativação da coagulação intravascular, culminando com a formação de fibrina intravascular e depósito na microcirculação com isquemia e trombose do órgão⁵⁶.

2.11 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

As proteínas são compostos essenciais de todas as células vivas, estão relacionadas às funções fisiológicas e desempenham papel importante na estrutura celular. São polímeros de alto peso molecular, cujas unidades básicas, os aminoácidos, estão ligadas entre si por ligações peptídicas. Dentre suas funções fisiológicas, destacam-se: catálise enzimática, transporte, capacidade de contração ou movimento, suporte e estrutura, imunoproteção e defesa, coagulação sanguínea, reguladores do crescimento e diferenciação celular⁵⁷. As proteínas plasmáticas podem ser separadas por eletroforese em duas frações principais, sendo uma a fração de albumina e a outra constituída pelas globulinas. A concentração total de proteínas no plasma é de aproximadamente 6,0 a 8,0 g/dL. A relação normalmente encontrada entre a albumina e a globulina é de 2:1⁵⁷.

As proteínas plasmáticas são ainda classificadas como proteínas de fase aguda, uma vez que embora presentes naturalmente no sangue, apresentam sua síntese alterada pelas células parenquimais no fígado em resposta a uma variedade de estresses como: inflamações, infecção bacteriana, radiações, toxinas, isquemia, choque térmico, entre outros, independente do fator desencadeante⁵⁷.

Em pacientes com infecção ou dano severo é realizada a reposição volêmica que leva ao aumento do volume plasmático, explicando parcialmente a hipoalbuminemia que ocorre nesses casos. A hipoalbuminemia é uma síndrome multifatorial resultante de mudanças em: volume plasmático, fluxo de plasma, distribuição de proteínas no organismo, catabolismo e síntese. Durante a fase aguda da sepse, a hipoproteïnemia pode ser explicada pelo fluxo de proteína para o espaço extravascular, onde é metabolizada. Na fase tardia da sepse, a albumina está preferencialmente localizada no espaço extravascular e é perdida pelo organismo por meio do balanço negativo entre síntese e catabolismo⁵⁸.

2.12 TNF- α

O fator de necrose tumoral é uma citocina produzida em várias circunstâncias frequentes durante a infecção, sendo um importante mediador nos processos fisiológicos. Somente em meados da década de 80, ficou claro que a toxicidade do lipopolissacarídeo é dependente de um fator endógeno produzido pelo hospedeiro⁵⁹, responsável por alterações fisiológicas e mortalidade associada a sepsis¹⁶.

Aggarwal et al., foram os primeiros a isolar o TNF- α a partir de células humanas da linhagem HL-60⁶⁰.

O TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda por bactérias gram negativas e outros organismos infecciosos. Sua principal fonte celular são os fagócitos mononucleares, embora possa ser sintetizado por células T antígeno estimuladas, células matadoras naturais (NK) e mastócitos. O estímulo mais importante para despertar a produção de TNF- α pelos macrófagos são os LPS⁶¹. Por sua vez, a produção e a ação do TNF- α são influenciadas por outras citocinas⁵⁹.

Inicialmente chamado caquexina, por acreditar-se que era o elemento responsável pelo estado caquético, característico das infecções crônicas, descobriu-se que esta e o TNF- α eram o mesmo elemento. O fator de necrose tumoral está intimamente envolvido na patogênese da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, associada ao choque séptico⁶².

Tracey et al., ao administrarem TNF- α em ratos, em quantidades semelhantes a produção endógena em resposta à endotoxina, causaram hipotensão, hiperglicemia, hipercalemia, acidose metabólica e morte¹⁵. Foram os primeiros a relatar a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos associada a administração intravenosa de TNF- α .

Em 1985, um estudo que realizou a imunização passiva de ratos contra caquexina, tornou - os resistentes ao efeito letal de endotoxina, como hipotensão, taquicardia e taquipnéia⁶³. Deste modo, parece que a caquexina não é capaz de causar alterações na homeostase feita pela endotoxina, mas é um elemento essencial para permitir uma série de eventos sucessivos que levam a esta alteração².

O TNF- α circulante, um homotrímero de 51 kD, é sintetizado a partir da clivagem de uma proteína não glicosilada de membrana tipo II, por uma metaloproteína de um fragmento de 17 kD⁶¹.

Principais efeitos do TNF- α na resposta do hospedeiro:

- a) estimula o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção⁶¹;
- b) aumenta a adesividade endotelial aos leucócitos⁶¹;
- c) estimula a secreção de quimiocinas pelas células endoteliais e macrófagos⁶¹;
- d) estimula a produção de interleucina-1 (IL-1) pelos fagócitos mononucleares⁶¹;
- e) induz a apoptose celular⁶¹.

Produzido em grande quantidade, nas infecções severas provoca anormalidades clínicas e patológicas sistêmicas mediante:

- a) ação de pirógeno endógeno⁶¹;
- b) aumento da síntese de proteínas séricas pelos hepatócitos⁶¹;
- c) alterações metabólicas da caquexia: supressão do apetite e da lipase lipoproteica⁶¹;
- d) inibição da contratilidade miocárdica⁶¹;
- e) inibição do tônus dos músculos lisos vasculares, resultando em queda da pressão sanguínea e choque⁶¹;
- f) trombose vascular⁶¹;

g) queda da concentração de glicose plasmática⁶¹.

A concentração sérica de TNF- α pode ser preditiva do prognóstico das infecções gram negativas graves⁶¹. Já a síndrome do choque séptico caracterizada por colapso vascular, coagulação intravascular disseminada e distúrbios metabólicos é devida a produção do TNF- α e outras citocinas^{61,14}. Mediadores inflamatórios como o TNF- α , são importantes no controle da infecção, pois o início rápido da resposta inflamatória está associado à baixa carga bacteriana e prediz a evolução da sepse severa. O pico de TNF- α tecidual ocorre 6h após LPC, declinando próximo aos valores de base em 24h. A liberação inicial e transitória de TNF- α é importante por se acreditar que pode desencadear uma série de eventos relacionados à mortalidade do hospedeiro⁷.

2.13 REPOSIÇÃO VOLÊMICA

Os mediadores inflamatórios na sepse desencadeiam vasodilatação. Inicialmente, esse efeito não é clinicamente aparente, pois a elevação da frequência cardíaca e do débito cardíaco compensam esta ação e mantêm a pressão sanguínea normal. Com o progresso da sepse, a habilidade do organismo exercer esta compensação é excedida e a hipotensão se torna aparente, necessitando que seja realizada a reposição volêmica²⁴.

O consenso de que grandes perdas de sangue devam ser repostas com líquido exógeno vem de séculos atrás. Logo após a descrição da circulação sanguínea por William Harvey's (1628), iniciaram-se tentativas de transfusão sanguínea sem sucesso por causa da incompatibilidade sanguínea. Isso resultou em uma alternativa efetiva: a produção de solução salina, em 1875. Com a descoberta dos tipos sanguíneos entre 1900 e 1902 e o fator Rh, em 1939, a transfusão sanguínea se tornou aceita e segura. Com o passar de algumas décadas, o risco de transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da hepatite permitiu a volta da procura por substitutos ao sangue. Para o sucesso da reposição volêmica, esta deve estar associada à prevenção da perda de sangue, a restrição do dano tecidual e ao manejo adequado das causas de choque séptico⁶⁴.

O fluido adequado para reanimação deve combinar características como a expansão de volume e a manutenção da capacidade sanguínea em carrear oxigênio, sem necessidade de prova cruzada ou risco de transmissão de doenças. Deve, ainda, restaurar e manter a composição e a distribuição de líquido nos compartimentos corporais⁶⁴.

Até o momento, a escolha mais adequada para reanimação, permanece sendo as soluções cristalóides isotônicas (solução de cloreto de sódio 0,9% e solução de ringer lactato), pelas seguintes razões: efetividade, disponibilidade, baixa morbidade e baixo custo⁶⁴. Em condições ideais, 25% do líquido infundido permanece no espaço intravascular e o restante se distribui pelo espaço extravascular⁴. O aumento do débito cardíaco e a oferta de oxigênio são proporcionais a expansão do compartimento intravascular⁴.

Perdas de até 15% a 30% da volemia permitem reposição isolada com solução cristalóide. Índices superiores exigem associação com transfusão sanguínea para manter a demanda de oxigênio dos tecidos. A quantidade de volume necessária para a reanimação é aproximadamente três vezes a perda de sangue estimada. Adota-se tradicionalmente, que a restauração da perfusão e a distribuição do oxigênio são importantes para melhorar o resultado do tratamento⁶⁴.

Pacientes com sepse, frequentemente são submetidos à infusão de grande volume de solução cristalóide isotônica e colóide. Assim, as alterações hemodinâmicas, característica na sepse em humanos, são baseadas em pacientes ditos sem tratamento, mas coletadas durante ou após reposição volêmica e frequentemente, após outras intervenções importantes²⁷.

O Colégio Americano de Cirurgiões recomenda o uso de soluções eletrolíticas aquecidas na reanimação inicial do choque. Esse tipo de líquido promove a expansão intravascular transitória e contribui para a estabilização do volume vascular mediante a reposição das perdas que ocorreram para o interstício e para o compartimento intracelular. A solução de ringer lactato é a escolha inicial para a reanimação volêmica e a solução salina isotônica é a segunda escolha⁶⁵.

Um estudo de ressuscitação na sepse realizado por Rivers e colaboradores, enfatizou a administração agressiva e precoce de cristalóides.

Pacientes com sepse severa ou choque séptico foram randomizados para 6h de terapia padrão, orientada pela pressão venosa central (PVC) [≥ 8 a 12 mmHg] e pela pressão arterial média (PAM) [≥ 65 mmHg] ou a 6h de terapia objetiva precoce, também orientada pela saturação venosa de oxigênio (SatVO₂) [$\geq 70\%$]. Aos pacientes submetidos à terapia objetiva precoce foi administrado mais líquido nas primeiras 6h ($4,981 \pm 2,984$ mL versus $3,499 \pm 2,438$ mL), assim como, mais dobutamina e transfusão de papa de hemácias. O tratamento padrão foi claramente inferior, causando acidose láctica persistente, maior alteração orgânica e maior mortalidade hospitalar (46,5% versus 30,5%). A ressuscitação inicial transformou a circulação hipodinâmica e hipovolêmica restabelecendo a oferta e a demanda de oxigênio sistêmico, melhorando a perfusão tecidual e a sobrevida nestes pacientes⁶.

A infusão de solução salina de cloreto de sódio aumenta o fluxo sanguíneo renal e apesar deste, há aumento da creatinina e oligúria, sugerindo diminuição da velocidade de filtração glomerular. O rápido desenvolvimento da disfunção orgânica sugere que a isquemia global não é responsável pela falência renal aguda de origem séptica¹².

A acidose dilucional é resultado da rápida expansão do volume extracelular, resultando na diminuição do bicarbonato sérico. O mecanismo responsável pela acidose, após a infusão de grandes volumes de solução de cloreto de sódio 0,9%, é atribuído a diluição do bicarbonato sérico (HCO₃⁻) mediante a reposição do plasma perdido com soluções sem HCO₃. A concentração do cloreto sérico é de aproximadamente 98 a 108 mEq/L. No organismo, os íons Cl⁻ e HCO₃⁻, inicialmente mantêm o equilíbrio reciprocamente. O resultado da infusão maciça de solução salina de cloreto de sódio 0,9% é a acidose metabólica hiperclorêmica⁶⁶. A acidose metabólica grave piora o desempenho cardíaco, diminuindo a resposta inotrópica às catecolaminas, reduz a perfusão renal e associado a hipotermia e coagulopatia piora o prognóstico⁶⁷.

Após a indução de hipervolemia aguda em voluntários saudáveis, por 30 minutos, infundindo 15 mL/kg de *hetastarch* em solução de cloreto de sódio 0,9% (Cl⁻ concentração, 154 mEq/L) ou albumina 5% (média de concentração de Cl⁻, 93 mEq/L), encontrou-se hiperclorêmia e diminuição do excesso de base depois de 210 minutos com *hetastarch* em solução salina,

mas não com albumina. Os autores do experimento concluíram que o cloreto é o fator mais importante na alteração do equilíbrio ácido-básico, após administração de solução de cloreto de sódio 0,9%⁶⁸. O ringer lactato e a solução salina de cloreto de sódio 0,9% são comumente usadas. No ringer lactato, a baixa concentração de Na^+ e a osmolaridade semelhante ao plasma aumentam o risco de edema cerebral pela passagem de líquido através da barreira hemato-encefálica, sugerindo uso criterioso em pacientes neurocirúrgicos. Já a solução salina de cloreto de sódio 0,9%, tem pequena hipertonidade em virtude do Na^+ que contém, oferecendo pequena vantagem em não exacerbar edema cerebral⁶⁹.

Williams et al., infundiram durante uma hora em 18 voluntários humanos saudáveis, 50 mL/kg/h de ringer lactato em uma ocasião e cloreto de sódio 0,9% em outra. Com o uso de ringer lactato a osmolaridade diminuiu de 4 para 3 mosm/L no final desta hora e retornou aos valores de base após a suspensão. Não houve alteração no grupo que usou solução salina de cloreto de sódio 0,9%. Também foi observado que o uso de solução salina de cloreto de sódio 0,9%, resultou numa redução significativa do pH no final da primeira hora e permaneceu baixo após 1h da suspensão da infusão. O intervalo de tempo até a primeira diurese, também foi maior com solução salina de cloreto de sódio 0,9%.

É interessante observar que a maioria dos voluntários que fez uso de solução salina de cloreto de sódio 0,9%, neste experimento, desenvolveu sonolência e diminuição da capacidade em responder perguntas simples, o que não ocorreu com os que receberam a infusão de solução de ringer lactato. A concentração de glicose não alterou em relação às duas infusões, nem em relação ao tempo. Concluiu-se que a escolha da reposição de líquido adequada depende em parte da concentração sérica de Na^+ . É prudente monitorizar a concentração de sódio sérico e a osmolaridade. Em muitos casos, parece apropriada a ressuscitação com a solução de ringer lactato, portanto, o uso rotineiro de solução salina de cloreto de sódio 0,9% deve ser desencorajado⁶⁹.

A solução salina de cloreto de sódio 0,9%, contém 154 mM de sódio e 154 mM de cloreto e solução de ringer lactato contém 130 mM de sódio, 5,4 mM de potássio, 1,8 mM de cálcio, 112 mM de cloreto e 27 mM de lactato⁷⁰.

Healey et al., compararam solução salina de cloreto de sódio 0,9% com solução de ringer lactato em dois modelos experimentais: um de hemorragia moderada e outro de hemorragia maciça, seguidos de ressuscitação⁷¹. O uso de solução salina de cloreto de sódio 0,9% e ringer lactato, resultou em efeitos fisiológicos equivalentes no grupo com hemorragia moderada e todos os ratos sobreviveram, esse resultado foi consistente com estudos prévios⁷². O grupo submetido à hemorragia maciça e ressuscitado com solução de cloreto de sódio 0,9%, associado a papa de hemácias, apresentou-se mais acidótico que o ressuscitado com o mesmo volume de solução de ringer lactato + papa de hemácias (pH $7,14 \pm 0,06$ versus $7,39 \pm 0,04$ respectivamente) e teve uma pior sobrevida (50% versus 100% respectivamente)⁷².

Um estudo com dois grupos randomizados de 12 pacientes submetidas à cirurgia ginecológica com normovolemia mantida, submetidas à infusão de solução salina de cloreto de sódio 0,9% ou solução de ringer lactato na dosagem de 30 mL/kg/h, mostrou que a infusão de solução salina de cloreto de sódio 0,9%, mas não de solução de ringer lactato, resulta em acidose metabólica hiperclorêmica. O pH médio cai de 7,41 para 7,28 e o cloreto médio aumenta de 104 para 115 mEq/L. Também houve maior tendência a perda sanguínea no grupo com solução salina de cloreto de sódio 0,9% e menor produção de urina após 20 minutos ($717 \text{ mL} \pm 459 \text{ mL}$ comparado a $1075 \text{ mL} \pm 799 \text{ mL}$)⁷⁰.

A infusão de grande quantidade de solução salina de cloreto de sódio 0,9%, pode alterar o equilíbrio ácido-base e associado a fatores como hipercarbia, hipoperfusão, hipóxia celular e produção de ácido láctico, muitas vezes presentes no indivíduo traumatizado, contribui para o desenvolvimento da acidose metabólica⁷³.

Por décadas, há controvérsias quanto ao benefício do uso de colóides ou cristalóides para reanimação volêmica em pacientes hipovolêmicos. A reanimação com colóides, quando comparada à com cristalóides, está associada a um aumento de 4% no risco absoluto de mortalidade. Nos pacientes avaliados que precisaram de reanimação volêmica, não houve evidências de diferença nos diversos tipos de dano: trauma, queimadura, sepse, vasculopatia e cirurgia. Os colóides não estão associados a melhora

na sobrevivência e são mais caros que os cristalóides⁷⁴. Outro autor teve resultados inconclusivos ao comparar ressuscitação com colóides *versus* cristalóides⁷⁵.

Um estudo baseado em modelo experimental concluiu que o uso de solução de ringer lactato e *hetastarch*, mas não o de plasma, exacerba a apoptose celular na perfusão de tecidos isquêmicos⁷⁶.

A reposição volêmica em estudo experimental, com solução de ringer lactato 32 mL/kg por 30 minutos ou solução salina hipertônica 7,5% 4 mL/kg, mostrou que a sepse causou redução no fluxo sanguíneo portal e renal de 45% e 25% respectivamente. Tanto a solução de ringer lactato, como a solução salina hipertônica 7,5%, demonstraram benefícios hemodinâmicos⁵².

A sepse pode induzir edema de células vermelhas e endoteliais, o que reduz a luz capilar e aumenta a viscosidade e a resistência hidrostática, causando um comprometimento precoce do fluxo sanguíneo na microcirculação. Grande volume de cristalóides é necessário durante a reanimação em pacientes sépticos, nas primeiras 24h (cerca de 6 a 10 litros)⁶.

A reposição volêmica em cães sépticos, com solução salina de cloreto de sódio 0,9% 32 mL/kg por 30 minutos, mostrou aumento acentuado e transitório do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo na veia porta, assim como, pequeno aumento na oferta de oxigênio sistêmico e da saturação venosa de oxigênio⁷⁷.

A ressuscitação em pacientes com sepse deve ser iniciada precocemente e seguir de forma vigorosa, pois o restabelecimento da oferta de oxigênio sistêmico e a perfusão de tecidos e órgãos são mais efetivas nesse estágio. As recomendações para reanimação volêmica são⁴:

- a) a infusão de líquidos deve ser o primeiro passo para suporte hemodinâmico em pacientes com choque séptico⁴;
- b) a solução cristalina isotônica e os colóides têm a mesma eficácia quando usados com os mesmos objetivos no suporte hemodinâmico⁴;
- c) a monitorização hemodinâmica invasiva deve ser avaliada em pacientes que não respondem prontamente a reanimação inicial.

Edema pulmonar pode ocorrer como complicação da reanimação volêmica e necessita controle da oxigenação arterial⁴;

- d) a concentração de hemoglobina deve ser mantida entre 8 e 10 mg/dL⁴.

Segundo Hirano et al., o sequestro de neutrófilos no rim, é menor em ratos submetidos à reposição volêmica com solução fisiológica, do que com solução de ringer lactato⁷⁸.

Estudos em carneiros sépticos demonstraram que a infusão de solução cristalóide não produz uma resposta estática. Produz aumento agudo do volume intravascular que diminui rapidamente com redistribuição e excreção do líquido.

Somam-se a isto, alterações repentinas no espaço intravascular, mudando o estado fisiológico e secundariamente, gerando resposta compensatória subjacente a alterações crônicas fisiológicas. Consequentemente, a análise cinética de mudanças na expansão de volume plasmático, em resposta à reposição volêmica sob uma variedade de circunstâncias fisiológicas, permite estimar o volume de líquido necessário⁷⁹.

3 MÉTODOS

3.1 MODELO DE ESTUDO

Para a realização deste estudo utilizou-se modelo experimental em ratos, obedecendo-se a Lei Federal nº 6.638 e as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, conforme registro nº 195 (anexo 2).

3.2 AMOSTRA

Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*, da linhagem Wistar) com idade entre 100 e 120 dias, peso entre 183g e 340g, provenientes do Biotério Central da PUCPR. A seleção da amostra probabilística foi feita através de sorteio, onde cada unidade amostral (rato) se fez corresponder a um número de 1 a 4. Com isso, o número de ratos em cada grupo não foi controlado, acarretando em grupos de tamanhos diferentes.

3.3 PREPARO DOS ANIMAIS E INDUÇÃO DA SEPSE ABDOMINAL

Os animais foram randomizados em quatro grupos:

- a) Grupo 1: ligadura e punção cecal (LPC);
- b) Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de cloreto de sódio 0,9%;
- c) Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato;
- d) Grupo 4: laparotomia.

3.3.1 Procedimento Cirúrgico

Após a aferição do peso, os animais foram submetidos à anestesia intramuscular com 0,1 ml/100g de peso do animal, a partir de uma mistura de 1 ml de quetamina (50mg) com 1 ml de xilasina 2% (20 mg)⁸⁰. O plano anestésico foi verificado, pela ausência do reflexo de retirada da pata ao estímulo doloroso.

Os animais foram posicionados em prancha cirúrgica e submetidos à tricotomia abdominal, antissepsia com polivinilpirorridona-iodo a 10%, e colocação de campos estéreis fenestrados.

Foi realizada laparotomia mediana de 3 cm em todos os animais e nos grupos 1, 2, e 3 o ceco foi ligado com fio de algodão 3-0, imediatamente abaixo da prega triangular íleo-cecal, permitindo o trânsito para o intestino grosso (Figuras 1 e 2). Em seguida, a superfície cecal anti-mesentérica foi submetida à cinco perfurações com agulha 40mm x 13mm (Figura 3). A seguir, foi realizada a síntese da parede abdominal em todos os grupos com fio monofilamentar de náilon 4-0, através de sutura contínua em dois planos: peritônio-músculo-aponeurótico e pele^{81,82}.

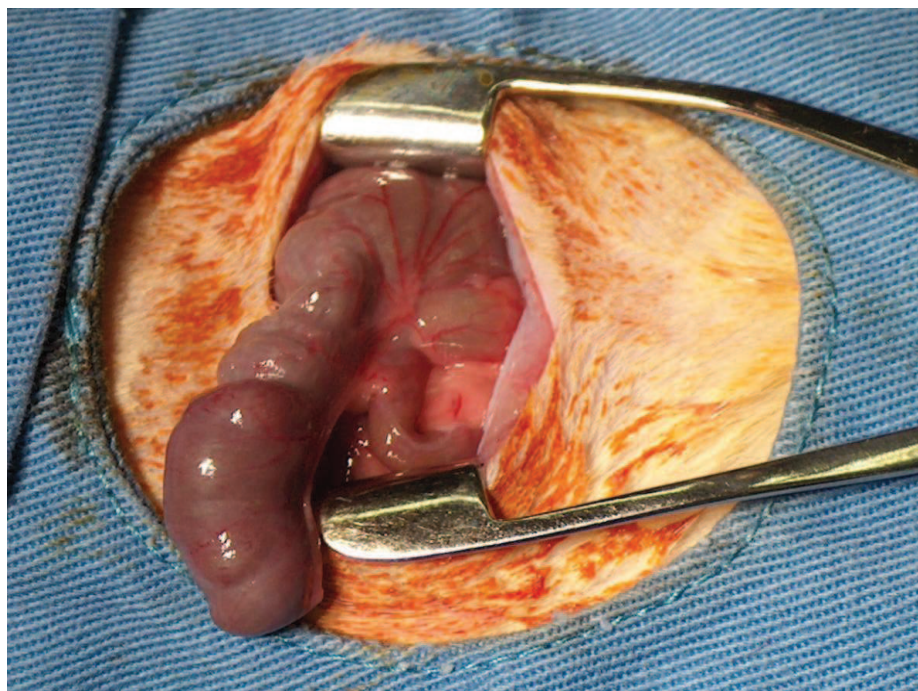


Figura 1 - Exposição do ceco no ponto onde será feita a LPC

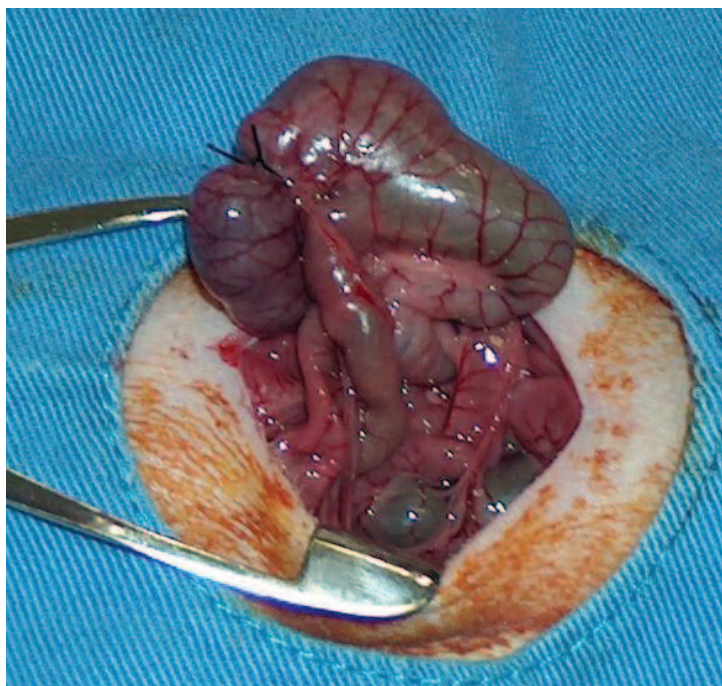


Figura 2 – Ceco após a ligadura

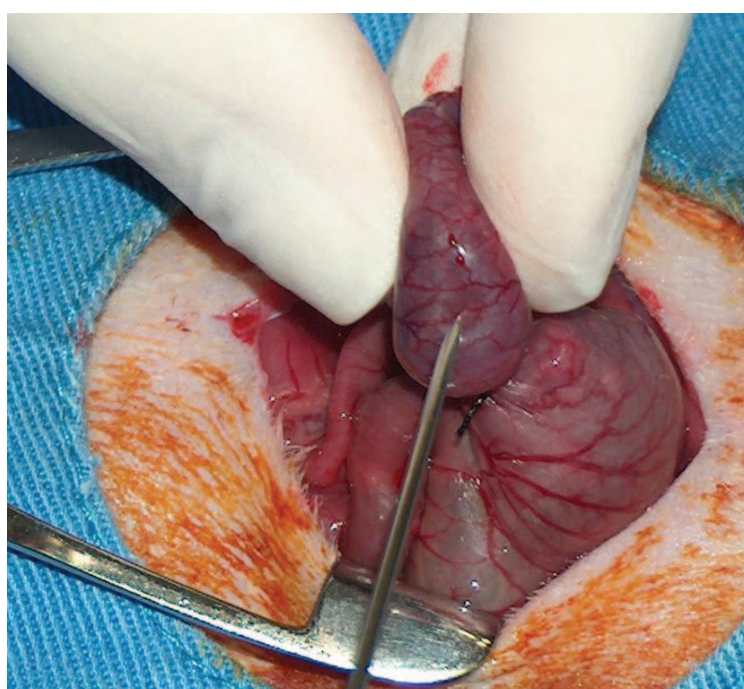


Figura 3 – Punção do ceco

Os espécimes, imediatamente após o término do ato operatório, receberam paracetamol 200mg/kg, dose administrada oralmente com finalidade analgésica⁸³.

Após a recuperação anestésica, os animais foram mantidos no biotério, em gaiolas identificadas por grupos e apropriadas para a espécie, com temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas e umidade do ar própria do ambiente. Todas as caixas foram colocadas em prateleiras a igual distância da fonte de luz. Os animais receberam ração padrão e água *ad libitum*.

Os animais dos grupos 2 e 3 receberam infusão de 50ml/kg das soluções de cloreto de sódio 0,9% e de ringer lactato respectivamente, por via subcutânea no momento da operação^{84,85}. Aguardou-se o período de seis horas, ao final do qual se espera sepse já instalada⁸⁵. Esta foi observada através de sinais clínicos como anorexia, apatia, ereção do pêlo, aumento da frequência respiratória e da frequência cardíaca⁸⁶.

Ao final de seis horas foi realizada nova laparotomia e avaliação do fluxo hepático e renal, através do fluxômetro a laser, em seis áreas pré-determinadas:

- área 1 - pólo caudal do rim a 0,5 cm da borda ventral do órgão;
- área 2 - centro do órgão a 0,5 cm do hilo renal;
- área 3 - pólo cranial a 0,5 cm da borda dorsal do órgão;
- área 4 - lobo esquerdo do fígado a 0,5 cm da borda inferior do órgão;
- área 5 - lobo esquerdo do fígado a 0,5 cm a direita da área 4 (Figuras 04 e 05);
- área 6 - lobo esquerdo do fígado a 0,5 cm a esquerda da área 4^{37,38}.

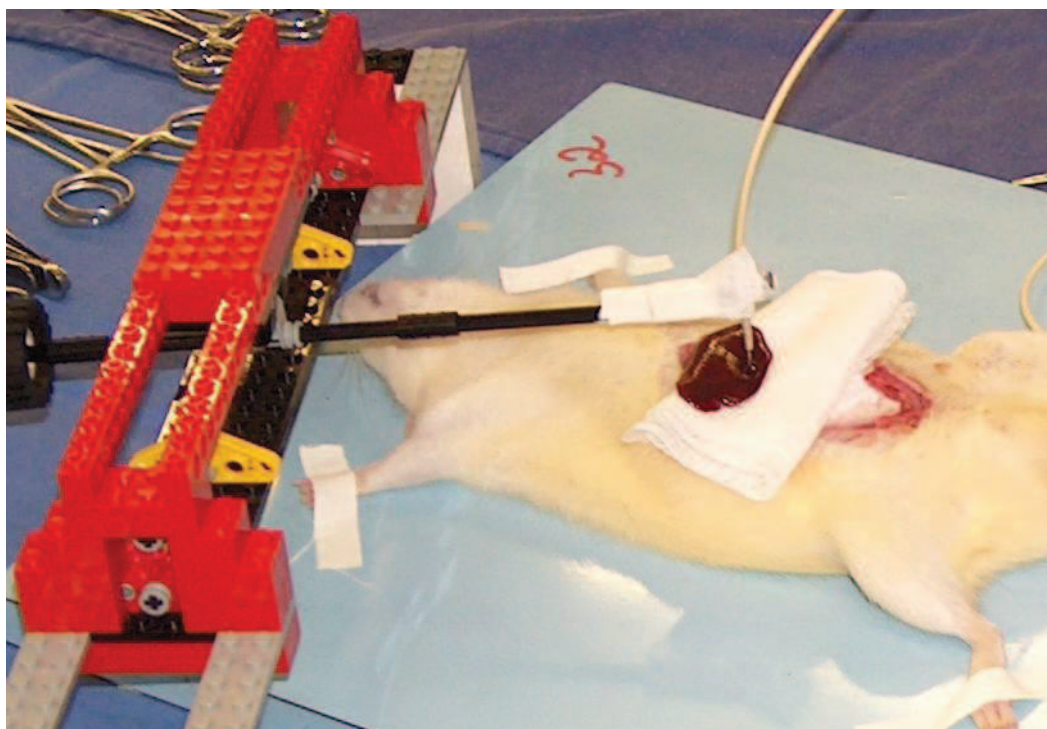


Figura 4 – Momento da mensuração de fluxo hepático

O desenvolvimento de peritonite foi observado com exame macroscópico da cavidade, através da presença de odor fétido, aderências, peritonite localizada ou difusa e a presença de um ou mais abscessos peritonias⁸⁶.

Na sequência foi coletado amostra de 3,0 ml de sangue por punção cardíaca para a leitura do hemograma, proteínas plasmáticas totais e dosagem doTNF- α ⁸⁷.

Por fim, foi realizada coleta de material para análise histopatológica de fígado, rins, pulmões e lavado peritoneal para cultura, nos grupos 1, 2 e 3.

Terminada esta análise, os animais foram submetidos à eutanásia por ex-sanguinação.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Os animais foram divididos em quatro grupos distintos: G1 (n=12), G2 (n=16), G3 (n=14) e G4 (n=8). Cada grupo recebeu uma designação: G1 - ligadura e punção cecal (LPC); G2 - LPC submetido à infusão de 50ml/kg de solução salina de cloreto de sódio 0,9 %, por via subcutânea no momento da operação; G3 - LPC submetido à infusão de 50ml/kg de solução de ringer lactato, por via subcutânea no momento da operação e G4 - Laparotomia.

3.4.1 Grupo 1: LPC

Os animais pertencentes a este grupo totalizaram 12 ratos. Estes foram anestesiados e submetidos à laparotomia com ligadura do ceco e perfuração. Em seguida foram recuperados da anestesia e reoperados, após seis horas, para os procedimentos de monitorização, avaliação de fluxo visceral hepático e renal, coleta de exames e material para lavado peritoneal e histologia, sendo em seguida submetidos à eutanásia.

3.4.2 Grupo 2: LPC e Reposição Volêmica com Solução Salina de Cloreto de Sódio 0,9%

Os animais pertencentes a este grupo totalizaram 16 ratos. Estes foram anestesiados, submetidos à monitorização conforme descrito e posterior laparotomia com ligadura do ceco e perfuração. Em seguida, foram recuperados da anestesia. Estes animais foram submetidos à reposição volêmica, com infusão de 50ml/kg da solução salina de cloreto de sódio 0,9% após a operação, por via subcutânea. Após seis horas, foram reoperados para realização dos procedimentos de monitorização, avaliação de fluxo visceral hepático e renal, coleta de exames e material para lavado peritoneal e histologia, sendo em seguida submetidos à eutanásia.

3.4.3 Grupo 3: LPC e Reposição Volêmica com Solução de Ringer com Lactato

Os animais pertencentes a este grupo totalizaram 14 ratos. Estes foram anestesiados, submetidos à monitorização conforme descrito e posterior laparotomia com ligadura do ceco e perfuração. Em seguida, foram recuperados da anestesia. Estes animais foram submetidos à reposição volêmica, com infusão de 50mL/kg solução de ringer lactato após a operação, por via subcutânea. Após seis horas, foram reoperados para realização dos procedimentos de monitorização, avaliação de fluxo visceral hepático e renal, coleta de exames e material para lavado peritoneal e histologia, sendo em seguida submetidos à eutanásia.

3.4.4 Grupo 4: Laparotomia

Os animais pertencentes a este grupo totalizaram 08 ratos. Estes foram anestesiados, submetidos à monitorização conforme descrito e posterior laparotomia sem ligadura do ceco e perfuração. Em seguida, foram recuperados da anestesia. Após seis horas, foram reoperados para realização dos procedimentos de monitorização, avaliação de fluxo visceral hepático e renal, coleta de exames e material para lavado peritoneal e histologia, sendo em seguida submetidos à eutanásia.

3.5 COLETA DE MATERIAL PARA DOSAGENS DE TNF- α E ANÁLISES SANGUÍNEAS

Mantendo-se o animal anestesiado, foi coletado o sangue da seguinte forma:

- a) punção cardíaca trans-esternal, com agulha descartável estéril de 25mm X 0,7mm;
- b) coletado 3,0 ml de sangue para hemograma, proteínas totais e TNF- α ;
- c) a coleta de material foi realizada nos grupos ao final do experimento (tempo 6).

3.5.1 Hemograma e Proteínas Totais

Para a leitura do hemograma e das proteínas plasmáticas totais foi usado um volume de 1,0 ml em tubo com EDTA (ácido etileno-diamino-tetratacético) e encaminhado para processamento.

3.5.2 TNF- α

Para a dosagem do TNF- α foi utilizado um volume de 2,0 ml de sangue que em seguida, foi imediatamente submetido à centrifugação por um período de 15 minutos a 5000 rpm, para separação do soro. Uma vez separado o soro este foi congelado a -70° C e dosado pelo método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), utilizando o kit Quantikine® da R&D Systems, Minneapolis, MN, USA. Foram seguidas as orientações do fabricante para o *kit* e as amostras foram analisadas em duplicata.

3.6 HISTOPATOLOGIA

Para coleta de tecidos para histologia foi realizada incisão tóraco-abdominal, dissecação do pulmão, secção da traquéia, ligadura do hilo pulmonar direito e infusão de formol a 10% tamponado na luz traqueal, até restabelecer o volume do pulmão esquerdo. Após ligadura e secção do hilo pulmonar esquerdo, o pulmão esquerdo foi colocado em frasco com formol a 10% tamponado. Prosseguiu-se o procedimento cirúrgico no abdome com técnica asséptica, da seguinte maneira: coleta da amostra do líquido peritoneal para cultura e retirada do fígado. A hepatectomia foi realizada através da dissecação, ligadura e secção com tesoura do ducto biliar comum, veia porta e artéria hepática com todos os seus ramos, seguido da dissecação, ligadura e secção da veia cava infra-hepática, com mobilização de fígado, através de secção das aderências peritoneais. Para nefrectomia esquerda total, o cólon, que no rato não está fixado a parede posterior e o intestino delgado, foram tracionados inferior e medialmente. Procedeu-se então ao descolamento do rim esquerdo, liberando-o da gordura retroperitoneal com pinça e tesoura. Após completa mobilização do órgão com ligadura do

pedículo renal, com o rim seguro por pinça no seu terço médio, iniciou-se a ressecção pelo pólo renal inferior.

Para o estudo histológico de cada espécime tecidual, os órgãos foram imersos em solução salina de cloreto de sódio 0,9%, colocados em frascos individuais contendo solução de formalina 10% tamponada com tampão de fosfato, identificados por etiqueta contendo código conhecido somente pelo cirurgião. Após a fixação, as amostras foram submetidas à procedimento histológico padrão com desidratação, diafanização e emblocamento em parafina^{88, 89}. Na sequência, as amostras foram submetidas à microtomia, com cortes seriados de aproximadamente 05µm (micrômetros) e corados em hematoxilina e eosina, coloração do PAS com digestão enzimática e tricômio de Gomori⁸⁹. Nas lâminas foram avaliados aspectos de resposta inflamatória aguda tecidual (Exsudato neutrofilico, infiltrado inflamatório mononuclear, polimorfonuclear e morfologia), por meio do microscópio óptico marca Olympus® modelo BX-51, utilizando-se o aumento de 10x e objetiva de 40x. O número de campos analisados por lâmina foi de 3. Os aspectos da resposta inflamatória foram graduados conforme demonstrado nos quadros 1 e 2, baseado no protocolo proposto por Vizzoto et al.,⁹⁰ seguindo escore numérico com notas negativas para as variáveis agudas e positivas para as crônicas.

Quadro 1 - Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos nos cortes corados pela Hematoxilina-eosina (HE)

PARÂMETROS	INTENSIDADE			
	Acentuada	Moderada	Discreta	Ausente
Neutrófilos	-3	-2	-1	0
Edema	-3	-2	-1	0
Congestão	-3	-2	-1	0
Monomorfonucleares	3	2	1	0
Tecido de granulação	3	2	1	0
Fibrose	3	2	1	0

Fonte: Vizzoto Jr. AO, et al.; J Bras Patol Med Lab. 2003; 39(2): 143-49.

Quadro 2 - Caracterização da fase do processo inflamatório de acordo com escores final de cada grupo

FASE DO PROCESSO INFLAMATÓRIO	ESCORE FINAL DE CLASSIFICAÇÃO
Agudo	-9 a -3
Sub-agudo	-2,9 a 3
Crônico	3,1 a 9

Fonte: Vizzoto Jr. AO, et al.; J Bras Patol Med Lab. 2003; 39(2): 143-49.

3.7 CULTURA DE LAVADO PERITONEAL

Para cultura do líquido peritoneal nos grupos 1, 2 e 3, foi realizado inoculação intraperitoneal de soro fisiológico, imediatamente após a segunda laparotomia, na quantidade de 3 ml e coletado material com seringa na quantidade de pelo menos 0,5 ml. O líquido recuperado foi diretamente semeado em um par de placas de Petry, com ágar MacConkey (100µl cada) e encubado a 37°C por 18 a 24 horas para posterior contagem. O resultado da média aritmética (que representa UFC/100 µl) foi multiplicado por 10, o que representou o número de UFC/ml de sangue. A partir destas colônias foi realizada a caracterização fenotípica presuntiva, por provas bioquímicas com meio de cultura.

3.8 PROTOCOLO DE PESQUISA

Para relato dos dados coletados foi utilizado protocolo conforme demonstrado no Anexo 1.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de variáveis contínuas (dados mensuráveis) foram analisados pelos testes estatísticos de análise de variância (ANOVA), modelo inteiramente casualizado e fatorial, seguido pelo teste de Tukey para a classificação das médias. A relação entre pares de variáveis foram analisadas pela correlação de Pearson e foram ilustradas em gráficos de

dispersão. A comparação dos dados de histologia do fígado, do rim e do pulmão, foi realizada com teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os cálculos foram realizadas com o uso de planilha do Excel (Microsoft) e pelo pacote estatístico Statística 8.0 (StatSoft). Significâncias estatísticas foram consideradas para $p < 0,05$.

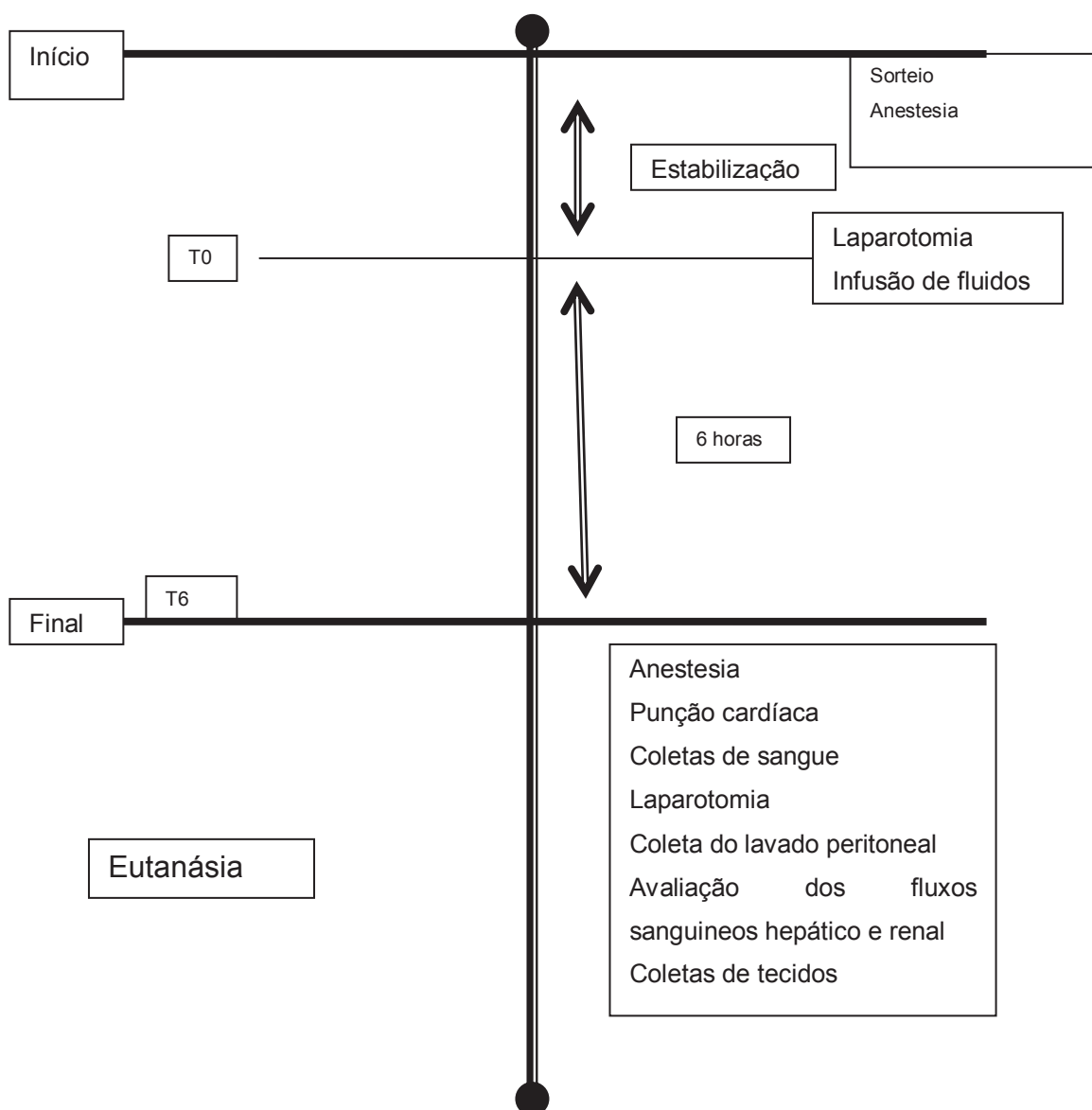


Figura 5 – Fluxograma cronológico do experimento

4 RESULTADOS

Durante o estudo foram utilizados 50 animais, dos quais houve 2 óbitos, ambos no grupo 1, imediatamente após a indução anestésica, não relacionados ao objeto de estudo.

4.1 PESO

Para este estudo foram utilizados ratos com peso médio de 307g. As médias dos pesos (tabela 1, figura 6) foram comparadas pela análise de variância, modelo inteiramente casualizado. Não houve diferença estatística na avaliação do peso entre os diferentes grupos ($p=0,37$).

Tabela 1 - Peso médio dos grupos 1,2 3 e 4 (em gramas)

	Fator	N	Média	D.P.	E.P.	LIMITE DE CONFIANÇA	
						-95,00%	+95,00%
Total		49	307,00	35,37	5,05	296,84	317,16
Grupo	1	11	306,82	45,59	13,74	276,19	337,44
	2	16	296,00	41,27	10,2	274,01	317,99
	3	14	311,00	25,47	6,81	296,29	325,70
	4	8	322,25	13,47	4,76	310,98	333,52

D.P.: Desvio padrão

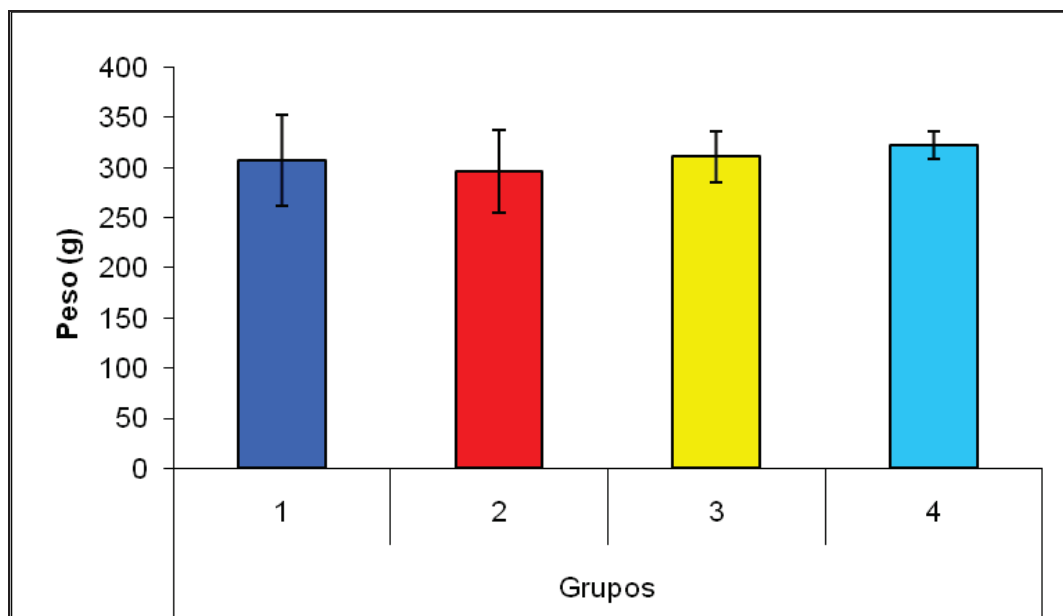
E.P.: Erro padrão

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia



Fonte: do autor

Figura 6 - Médias dos pesos dos animais dos grupos 1,2,3 e 4

(Grupo 1: LPC; Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%; Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato; Grupo 4: Laparotomia. As barras de erro representam o desvio padrão).

4.2 VOLUME INFUNDIDO

Durante o procedimento os grupos que receberam alguma forma de reposição volêmica (grupos 2 e 3), também não apresentaram diferenças entre si em relação ao volume infundido (tabela 2, figura 7), após comparação das médias pela análise de variância, modelo inteiramente casualizado ($p=0,26$).

Tabela 2 - Volume médio infundido nos grupos 2 e 3 (em ml)

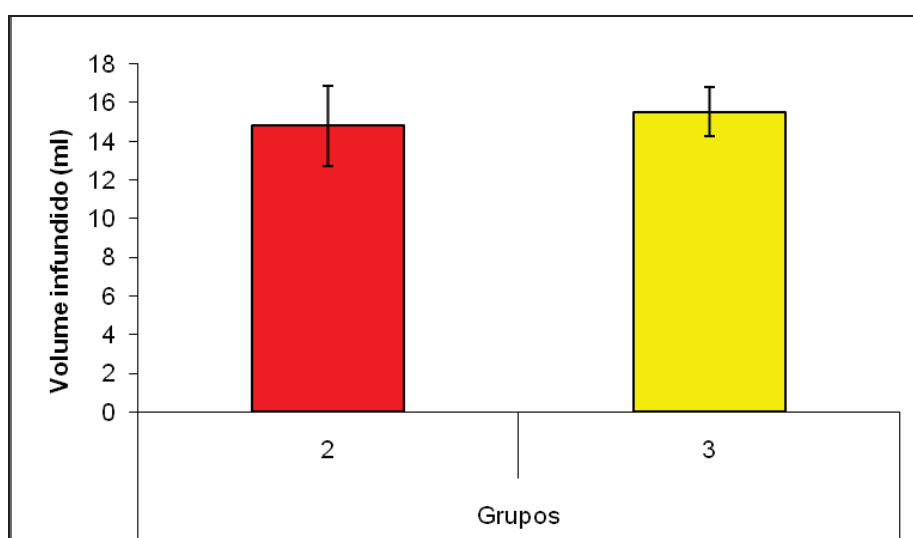
Fator	N	Média	D.P.	E.P.	LIMITE DE CONFIANÇA	
					-95,00%	+95,00%
Total	30	15.14	1.75	0.32	14.48	15.79
Grupo	2	14.79	2.06	0.51	13.70	15.89
	3	15.53	1.27	0.34	14.79	16.26

D.P.: Desvio padrão

E.P.: Erro padrão

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato



Fonte: do autor

Figura 7 - Médias do volume infundido nos animais dos grupos 2 e 3

(Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%; Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato. As barras de erro representam o desvio padrão).

4.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA DA INSPEÇÃO DA CAVIDADE ABDOMINAL

A confirmação da peritonite foi realizada através de inspeção macroscópica e análise laboratorial com realização de cultura, conforme evidenciado na tabelas abaixo, separados por grupos.

A análise macroscópica dos achados da inspeção da cavidade abdominal estão relatados na tabela 3. Estes dados mostram a presença de sinais de peritonite nos animais dos grupos 1, 2 e 3 e ausência nos animais do grupo 4.

Tabela 3 - Achados de inspeção de cavidade abdominal dos animais

ANIMAL	INSPEÇÃO DA CAVIDADE ABDOMINAL			
	Distensão de Alças	Bloqueio de ceco	Líquido livre	Necrose de ceco
G1	Sim	Não	Sim	Não
G2	Sim	Não	Sim	Não
G3	Sim	Não	Sim	Não
G4	Não	Não	Não	Não

4.4 CULTURA DO LÍQUIDO PERITONEAL

Na cultura do lavado peritoneal nos animais submetidos à LPC, houve crescimento de *E. coli*, *Proteus sp*, *Klebsiella*, *Streptococcus sp*, bactérias lactose negativas e positivas.

4.5 FLUXO HEPÁTICO

O fluxo hepático médio (tabela 4, figura 8) foi comparado pela análise de variância, modelo fatorial, indicando semelhança entre os grupos, conforme tabela 5.

Tabela 4 - Fluxo hepático médio nos grupos 1,2,3 e 4 (em ml/min/100g)

LIMITE DE CONFIANÇA							
Fator	N	Média	D.P.	E.P.	-95,00%	+95,00%	
Total	145	13.57	5.91	0.49	12.60	14.54	
Grupo	1	31	11,70	5,51	0,99	9.68	13.73
	2	48	13.35	6.92	1.00	11.34	15.35
	3	42	15.87	5.35	0.82	14.20	17.53
	4	24	12.40	3.82	0.78	10.79	14.02

D.P.: Desvio padrão

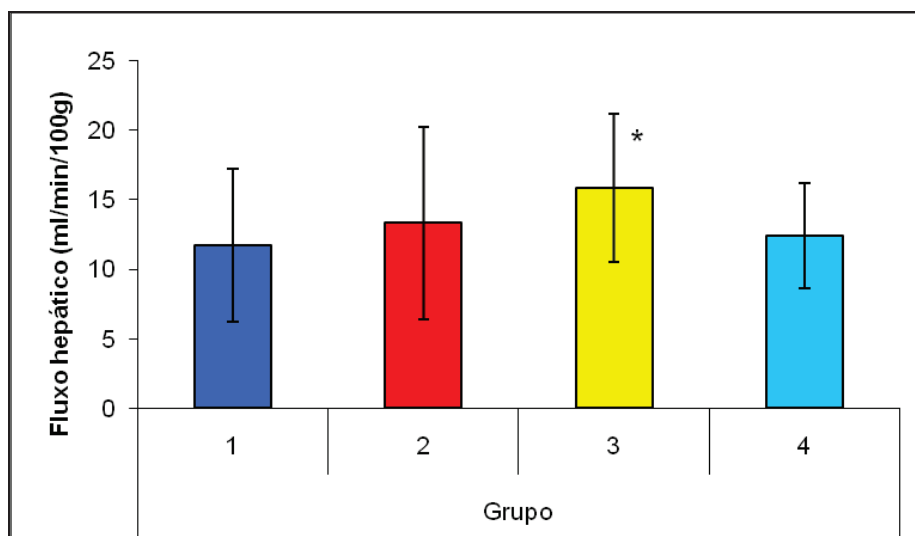
E.P.: Erro padrão

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia



Fonte: do autor

Figura 8 - Fluxo hepático médio nos grupos 1,2,3 e 4 (em ml/min/100g)

(Grupo 1: LPC; Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%; Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato; Grupo 4: Laparotomia. As barras de erro representam o desvio padrão).

A comparação entre os grupos realizada pelo teste de Tukey, não evidencia diferença significativa entre eles. A tabela 5 mostra o resultado estatístico da comparação entre os grupos.

Tabela 5 - Nível de significância (p) das diferenças do fluxo hepático médio entre os grupos 1,2,3, e 4, pelo teste de Tukey

GRUPO	{1}	{2}	{3}	{4}
1		0.98	0.58	0.99
2	0.98		0.96	0.99
3	0.58	0.96		0.93
4	0.99	0.99	0.93	

D.P.: Desvio padrão

E.P.: Erro padrão

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia

4.6 FLUXO RENAL

A comparação das médias do fluxo renal (tabela 6, figura 9) foi realizada pela análise de variância, modelo fatorial. O grupo 1 apresentou o menor fluxo renal, com média de 21,05 ml/min/100g, enquanto o grupo 4, obteve o fluxo médio mais alto (40,30 ml/min/100g).

Tabela 6 - Fluxo renal médio nos grupos 1,2,3,e 4 (em ml/min/100g)

	Fator	N	Média	D.P.	E.P.	LIMITE DE CONFIANÇA	
						-95,00%	+95,00%
Total		144	28.25	15.76	1.31	25.05	30.85
Grupo 1	1	30	21,05	9,64	1.92	17.45	24.65
Grupo 2	2	48	30.53	16.99	2.45	25.60	35.46
Grupo 3	3	42	23.92	12.08	1.86	20.15	27.68
Grupo 4	4	24	40.30	17.71	3.61	32.82	47.78

D.P.: Desvio padrão

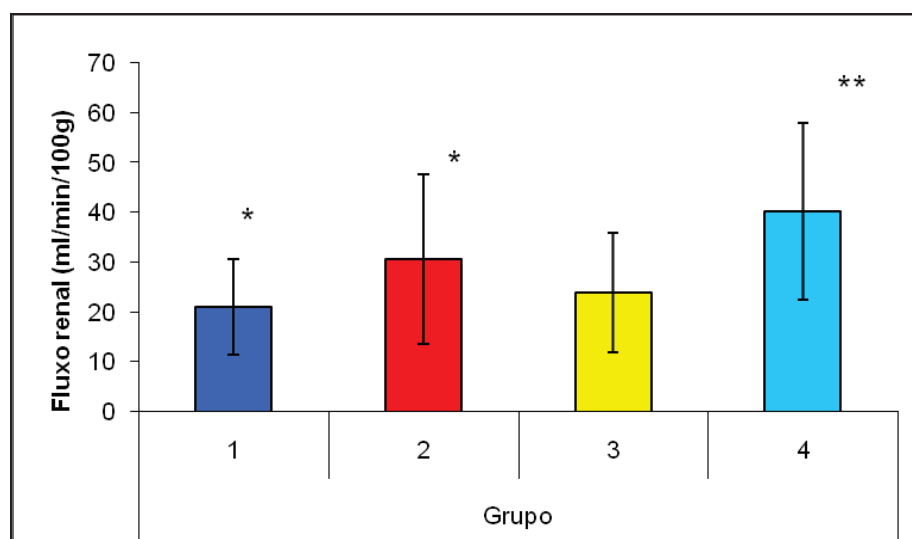
E.P.: Erro padrão

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia



Fonte: do autor

Figura 9 - Fluxo renal médio nos grupos 1,2,3 e 4 (em ml/min/100g)

*Grupo1 diferença estatística significativa em relação ao grupo 2;

** Grupo 4 diferença estatística significante em relação a todos os grupos;

(Grupo 1: LPC; Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%;

Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato; Grupo 4:

Laparotomia. As barras de erro representam o desvio padrão).

A comparação entre os grupos, estudada pelo teste de Tukey (tabela 7), evidencia que o grupo 4 apresentou diferença significativa com relação aos outros grupos. Também apresentaram significância estatística a comparação do grupo 1 com o grupo 2.

Tabela 7 - Nível de significância (p) das diferenças do fluxo renal médio por grupo, nos grupos 1, 2, 3 e 4, pelo teste de Tukey

GRUPO	{1}	{2}	{3}	{4}
1		0.00	0.61	0.00
2	0.00		0.10	0.01
3	0.60	0.10		0.00
4	0.00	0.01	0.00	

Grupo 1: LPC

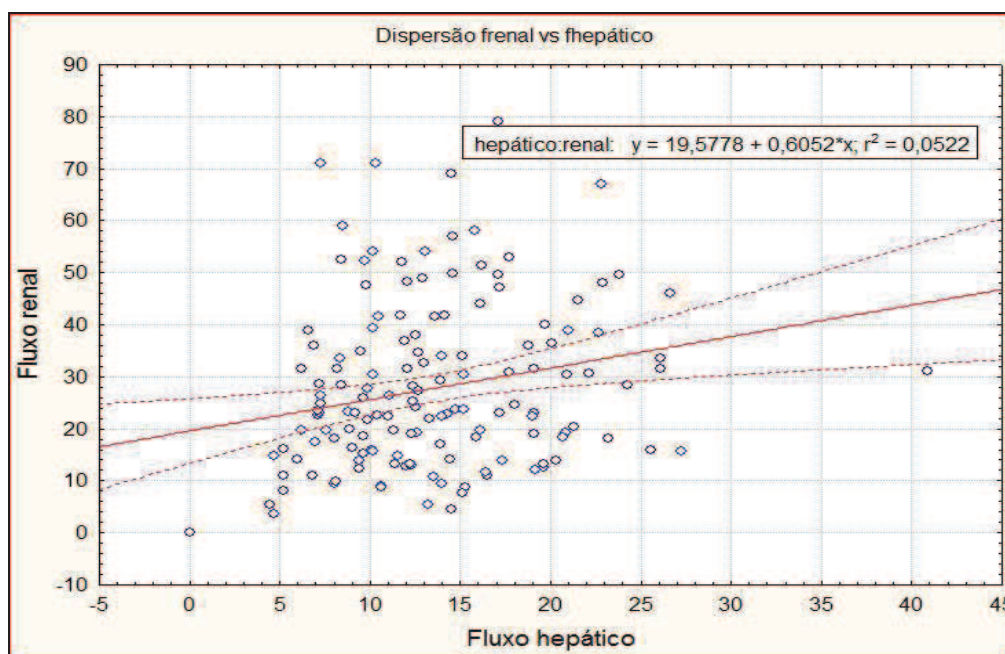
Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia

As mensurações de fluxo hepático e renal foram repetidas por três vezes em cada animal, de cada grupo, sendo que as comparações entre as repetições foram semelhantes entre si ($p = 0,86$).

A comparação dos fluxos sanguíneos, renal e hepático, não mostrou correlação linear significativa (figura 10).



Fonte: do autor

Figura 10 - Gráfico de dispersão da correlação entre o fluxo renal e o fluxo hepático pela análise de covariância nos grupos 1, 2, 3 e 4

4.7 HEMOGRAMA

4.7.1 Hemoglobina

As médias de hemoglobina nos grupos (tabela 8, figura 11) foram avaliadas pela análise de variância modelo, inteiramente casualizado. Houve comportamento semelhante nos grupos ($p = 0,29$). A média nos grupos variou de 16,29 g/dl no grupo 3 a 18,25 g/dl no grupo 4.

Tabela 8 - Nível de hemoglobina média (g/dl) nos grupos 1,2,3 e 4

	Fator	N	Média	D.P.	E.P.	LIMITE DE CONFIANÇA	
						-95,00%	+95,00%
Total		46	17.12	2.80	0.41	16.29	17.95
Grupo	1	10	17.96	1.74	0.55	16.71	19.21
	2	14	16.71	4.10	1.10	14.34	19.07
	3	14	16.29	2.27	0.61	14.98	17.59
	4	8	18.25	1.16	0.41	17.28	19.22

D.P.: Desvio padrão

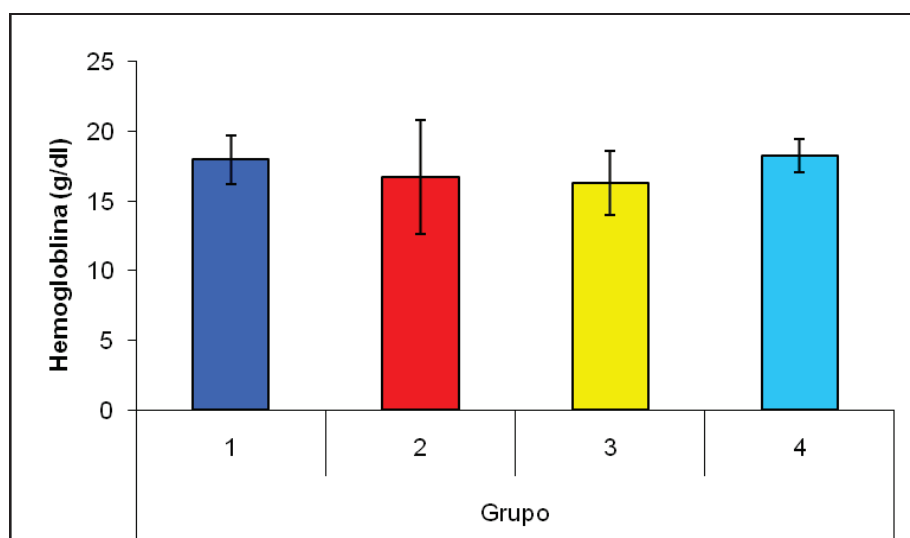
E.P.: Erro padrão

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia



Fonte: do autor

Figura 11 - Nível de hemoglobina média (g/dl) nos grupos 1,2,3 e 4

(Grupo 1: LPC; Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%; Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato; Grupo 4: Laparotomia. As barras de erro representam o desvio padrão).

4.7.2 Hematócrito

As médias do hematócrito dos grupos (tabela 9, figura 12) comparadas pelo teste de variância, modelo inteiramente casualizado, também mostraram comportamento semelhante nos grupos ($p=0,15$). Sua média variou de 47,43 % nos grupos 2 e 3 até 54,00 % no grupo 4.

Tabela 9 - Nível do hematócrito médio (em %) nos grupos 1, 2, 3, e 4

	Fator	N	Média	D.P.	E.P.	LIMITE DE CONFIANÇA	
						-95,00	+95,00%
Total		46	49.48	7.82	1.15	47.15	51.80
Grupo	1	10	51.60	3.40	1.08	49.16	54.04
	2	4	47.43	10.70	2.86	41.25	53.60
	3	14	47.43	7.47	2.00	43.11	51.74
	4	8	54.00	4.00	1.41	50.66	57.34

D.P.: Desvio padrão

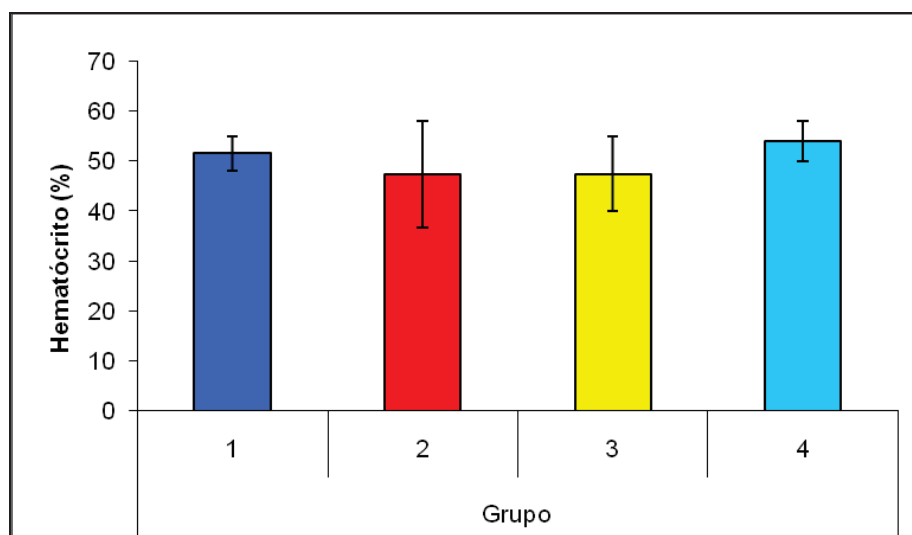
E.P.: Erro padrão;

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia



Fonte: do autor

Figura 12 - Nível do hematócrito médio (em %) nos grupos 1, 2, 3, e 4

(Grupo 1: LPC; Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%; Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato; Grupo 4: Laparotomia. As barras de erro representam o desvio padrão).

4.7.3 Leucócitos

As médias dos leucócitos dos grupos (tabela 10, figura 13) foram comparadas pela análise de variância, modelo inteiramente casualizado. O grupo 1 apresentou a menor contagem média ($5.450 /\text{mm}^3$) e o grupo 4 a maior média de $10.387 /\text{mm}^3$. Foram também os grupos 1 e 4, que comparados entre si, apresentaram diferença significativa na contagem média de leucócitos, como pode ser visto na tabela 11, que mostra o nível de significância da diferença entre os grupos pelo teste de Tukey.

Tabela 10 - Média da contagem de leucócitos (mil/mm³) nos grupos 1,2,3 e 4

Fator	n	Média	D.P.	E.P.	LIMITE DE CONFIANÇA	
					-95,00%	+95,00%
Total	46	7445.65	3021.38	445.48	6548.41	8342.89
Grupo	1	10	5450.00	2229.72	705.10	3854.95 7045.05
	2	14	7335.71	2836.74	758.15	5697.83 8973.60
	3	14	7300.00	3323.34	888.20	5381.16 9218.84
	4	8	10387.50	1090.79	385.65	9475.58 11299.42

D.P.: Desvio padrão

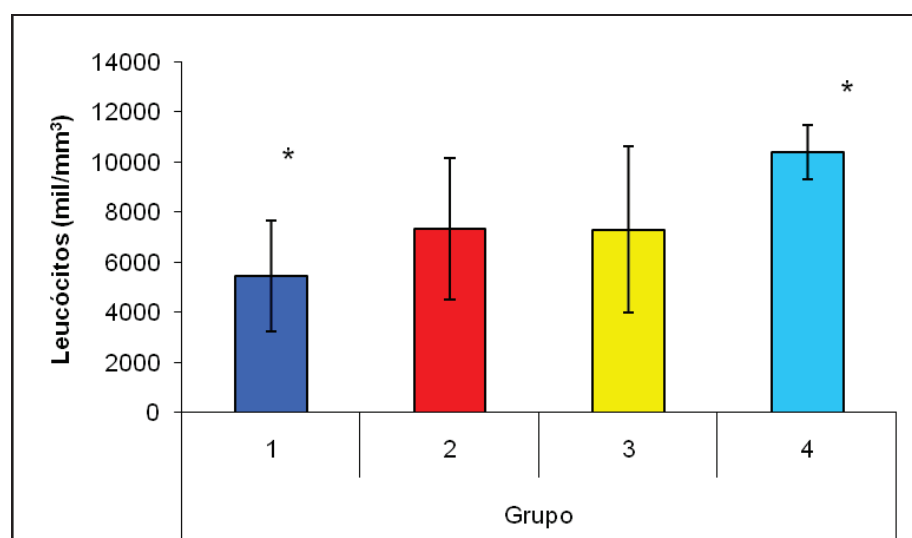
E.P.: Erro padrão

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4 Laparotomia



Fonte: do autor

Figura 13 - Média da contagem de leucócitos (mil/mm³) nos grupos 1, 2, 3 e 4

(Diferença estatística entre os grupos 1 e 4. Grupo 1: LPC; Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%; Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato; Grupo 4: Laparotomia. As barras de erro representam o desvio padrão).

Tabela 11 - Nível de significância (p) das diferenças de contagem de leucócitos entre os grupos 1, 2, 3 e 4, pelo teste de Tukey

	GRUPO	{1}	{2}	{3}	{4}
1	1		0.34	0.35	0.00
2	2	0.34		1.00	0.06
3	3	0.35	1.00		0.06
4	4	0.00	0.06	0.06	

Grupo 1: LPC;

Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato

Grupo 4: laparotomia

4.7.4 Neutrófilos Segmentados

As médias dos neutrófilos segmentados dos grupos (tabela 12, figura 14) comparadas pela análise de variância, amostra inteiramente casualizada, mostraram comportamento semelhante entre os grupos ($p=0,09$).

Tabela 12 - Média da contagem de neutrófilos segmentados (%) nos grupos 1, 2, 3 e 4

	Fator	N	Média	D.P.	E.P.	LIMITE DE CONFIANÇA	
						-95,00%	+95,00%
Total		46	55.22	13.96	2.06	51.07	59.36
Grupo	1	10	51.00	7.29	2.30	45.79	56.21
	2	14	50.07	17.78	4.75	39.80	60.34
	3	14	58.71	13.11	3.50	51.14	66.28
	4	8	63.37	9.93	3.51	55.07	71.67

D.P.: Desvio padrão

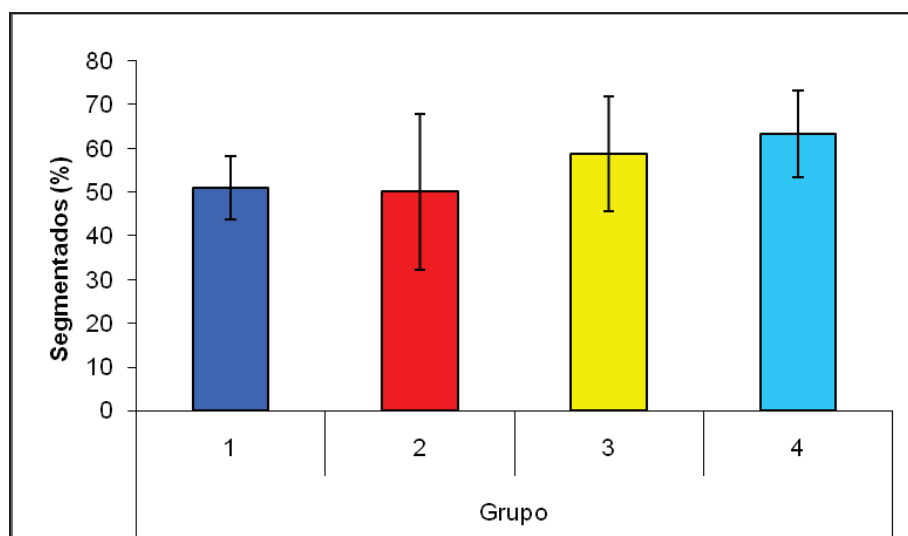
E.P.: Erro padrão

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia



Fonte: do autor

Figura 14 - Média da contagem de neutrófilos segmentados (%) nos grupos 1, 2, 3 e 4

(Grupo 1: LPC; Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%; Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato; Grupo 4: laparotomia. As barras de erro representam o desvio padrão).

4.7.5 Linfócitos

As médias de linfócitos dos grupos (tabela 13, figura 15) comparadas pela análise de variância, modelo inteiramente casualizado, mostraram comportamento semelhante entre os grupos ($p=0,99$).

Tabela 13 - Média da contagem de linfócitos (%) nos grupos 1, 2, 3 e 4

	Fator	N	Média	Desv.Pad.	Err.Pad.	LIMITE DE CONFIANÇA	
						-95,00%	+95,00%
Total		46	31.87	10.54	1.55	28.74	35.00
Grupo	1	10	32.20	8.46	2.67	26.15	38.25
	2	14	32.57	12.54	3.35	25.33	39.81
	3	14	31.35	11.27	3.01	24.85	37.86
	4	8	31.12	9.56	3.38	23.13	39.12

D.P.: Desvio padrão

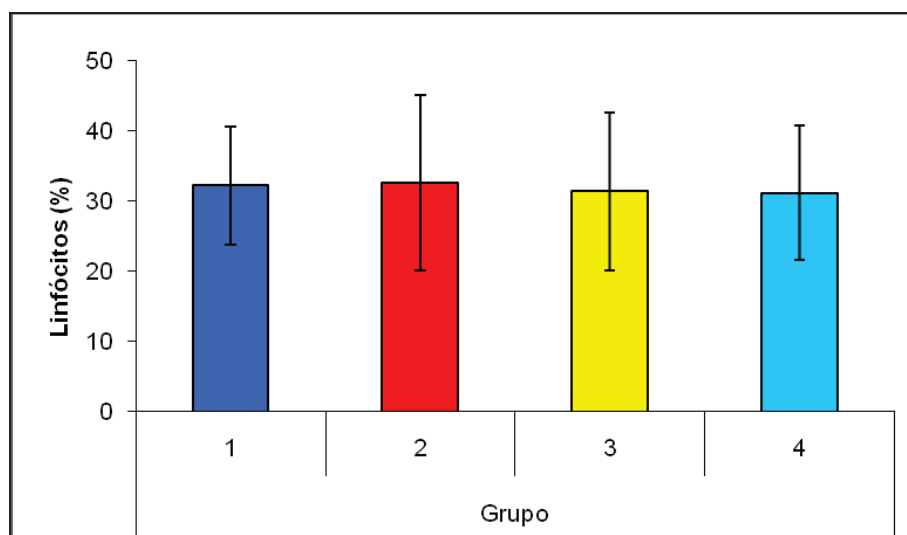
E.P.: Erro padrão

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia



Fonte: do autor

Figura 15 - Média da contagem de linfócitos (%) nos grupos 1, 2, 3 e 4

(Grupo 1: LPC; Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%; Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato; Grupo 4: Laparotomia. As barras de erro representam o desvio padrão).

4.7.6 Proteínas Plasmáticas Totais

A comparação das médias das proteínas plasmáticas totais (tabela 14, figura 16) realizada pela análise de variância, modelo inteiramente casualizado, mostrou comportamento heterogêneo entre os grupos ($p=0,00$).

Tabela 14 - Nível médio de proteínas totais (em g/dl) nos grupos 1, 2, 3 e 4

						LIMITE DE CONFIANÇA	
		N	Média	D.P.	E.P.	-95,00%	+95,00%
Total		46	5.01	0.49	0.07	4.87	5.16
Grupo	1	10	5.40	0.49	0.15	5.05	5.75
	2	14	4.84	0.39	0.10	4.62	5.07
	3	14	4.67	0.31	0.08	4.49	4.85
	4	8	5.45	0.26	0.09	5.24	5.66

D.P.: Desvio padrão

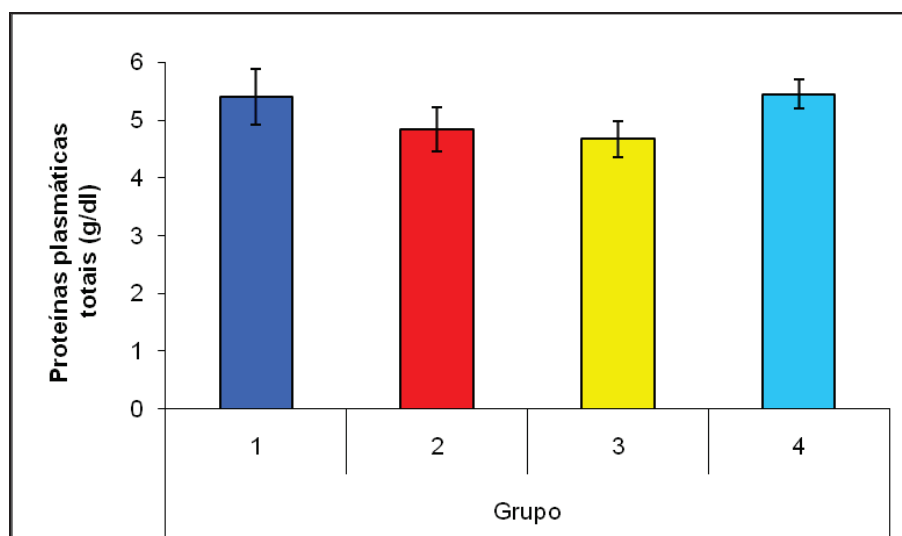
E.P.: Erro padrão

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia



Fonte: do autor

Figura 16 - Nível médio de proteínas totais (em g/dl) nos grupos 1, 2, 3 e 4

(Grupo 1: LPC; Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%; Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato; Grupo 4: laparotomia. As barras de erro representam o desvio padrão).

A análise comparativa entre os grupos pelo teste de Tukey indica que houve diferença estatística significativa. Os grupos 2 e 3 são estatisticamente idênticos e diferentes dos grupos 1 e 4, que por sua vez são idênticos entre si.

Tabela 15 - Nível de significância (p) das diferenças da dosagem de proteínas totais entre os grupos 1, 2, 3 e 4, pelo teste de Tukey

GRUPO		{1}	{2}	{3}	{4}
1	1		0.00	0.00	0.99
2	2	0.00		0.62	0.00
3	3	0.00	0.62		0.00
4	4	0.99	0.00	0.00	

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia

4.8 TNF- α

A comparação das médias do TNF- α (tabela 16, figura 17) avaliadas pela análise de variância demonstrou comportamento semelhante entre os grupos. As médias variaram de 26,24 pg/dl no grupo 4 até 77,67 pg/dl no grupo 3. Apesar das diferenças aparentes, a dispersão dos valores de TNF- α explica a falta de significância na comparação entre os grupos (figura 18).

Tabela 16 - Nível médio das dosagens de TNF- α (em pg/dl) nos grupos 1, 2, 3 e 4

Fator	N	Média	D.P.	E.P.	LIMITE DE CONFIANÇA	
					-95,00%	+95,00%
Total	43	61.08	66.75	10.18	40.54	81.63
Grupo	1	11	67.53	100.24	30.22	0.19
	2	14	49.39	25.03	6.69	34.94
	3	14	77.67	72.01	19.25	36.09
	4	4	26.24	3.21	1.60	21.13

D.P.: Desvio padrão

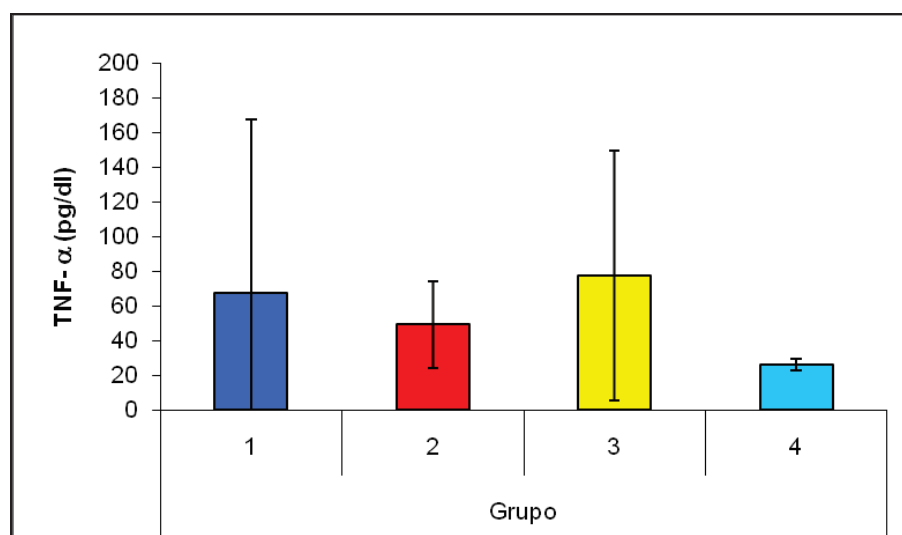
E.P.: Erro padrão

Grupo 1: LPC

Grupo 2: LPC e reposição com solução salina de NaCl 0,9%

Grupo 3: LPC e reposição com solução de ringer lactato

Grupo 4: Laparotomia

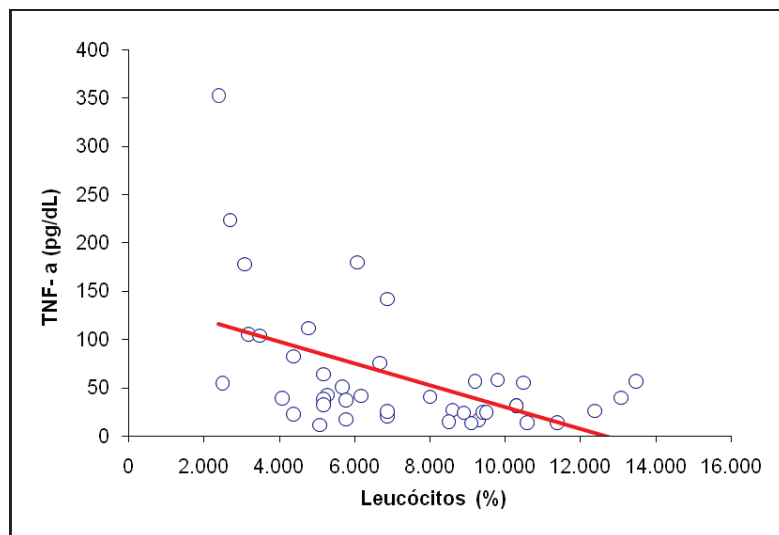


Fonte: do autor

Figura 17 - Nível médio das dosagens de TNF- α (em pg/dl) nos grupos 1, 2, 3 e 4

(Grupo 1: LPC; Grupo 2: LPC e reposição como solução salina de NaCl 0,9%; Grupo 3: LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato; Grupo 4: Laparotomia. As barras de erro representam o desvio padrão).

A comparação entre os níveis de TNF- α e a contagem de leucócitos mostrou correlação linear significativa ($r=0,58$ $p=0,00$), com relação inversa entre as variáveis (figura 18).



Fonte: do autor

Figura 18 - Gráfico de dispersão da correlação entre TNF- α e leucócitos pela análise de covariância nos grupos 1, 2, 3 e 4

4.9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A avaliação histológica do tecido renal, pulmonar e hepático, foi realizada com o teste de Kruskal Wallis, e não mostrou diferenças significativas entre os grupos avaliados, com presença de inflamação aguda e sub-aguda no escore de inflamação histológica dos grupos.

5 DISCUSSÃO

Podemos afirmar que apesar dos avanços tecnológicos, diagnósticos e terapêuticos dos últimos anos, pouco progresso foi conseguido em relação a mudança de mortalidade na sepse. Isto se deve à complexidade das relações agressor-hospedeiro que não podem ser reguladas e que dependem muito mais da resposta do hospedeiro do que da intervenção terapêutica. Para tentar diminuir a mortalidade da sepse, algumas estratégias certamente são benéficas, tais como, o reconhecimento precoce, uma intervenção inicial agressiva contra os distúrbios hemodinâmicos e o manejo racional dos antimicrobianos⁹¹.

5.1 MODELO DE ESTUDO

Para desenvolver o presente estudo, optou-se por um modelo experimental, pois os modelos clínicos apresentam variáveis incontrolláveis que dificultam sua interpretação. O animal escolhido foi o rato por apresentar um ciclo de vida curto, uniformização da amostra, baixo custo de aquisição e manutenção, fácil obtenção e transporte^{26,27}.

A seleção da amostra probabilística foi feita através do sorteio de cada rato, para compor um dos quatro grupos. Esta forma de sorteio determinou grupos de tamanhos diferentes, uma vez que o número de ratos em cada grupo não foi controlado. O sorteio foi adotado para evitar influência por tendências, preferências, fatores subjetivos e pessoais diversos. Este procedimento de casualização não interferiu na avaliação do tratamento, uma vez que na análise estatística foram utilizados testes paramétricos que suportam tamanhos diferentes na comparação dos grupos⁹².

A homogeneidade da amostra pode ser observada no peso e no volume infundido dos grupos 2 e 3, conforme visto nos resultados. Houve dois casos de óbito, e mesmo assim, após a indução anestésica, não relacionado a sepse ou sua resposta.

A reposição volêmica através da via subcutânea foi escolhida por apresentar uma absorção mais rápida que a via oral (1 a 3h), não sofrer ação de fatores que afetam a absorção gastrointestinal, ser absorvida pelo fluxo sanguíneo local e apresentar a mesma eficácia que a administração intravenosa porém com maior simplicidade de realização no rato. A reposição volêmica foi realizada após a indução da LPC, pois sem ela esta técnica causa o desenvolvimento rápido do choque, sendo que após este procedimento a mortalidade é reduzida com resposta fisiopatológica semelhante a observada na sepse em humanos^{34,99}. A infusão de fluidos após a LPC também permitiu avaliar o comportamento TNF, principal mediador da resposta inflamatória, após a reposição volêmica. Uma vez, que o mesmo se altera em menos de 1h após LPC e está associado a disfunção orgânica induzida pela sepse^{61,62}.

Embora sepse cause significativa morbidade e mortalidade e seja fruto de extensas e inúmeras investigações, a sua fisiopatologia básica ainda não é totalmente esclarecida. Neste estudo foram investigadas algumas alterações inflamatórias e fisiopatológicas, de um modelo de sepse com LPC, modelo que induz à peritonite através da flora intestinal mista, reproduzindo a imunologia complexa da sepse⁵³.

LPC é um modelo experimental desenvolvido por Wichterman et al., em 1980, frequentemente referido em pesquisas sobre sepse^{81,93}. Este modelo, além da simplicidade por não necessitar preparo de bactérias, tem como principal vantagem o fato de resultar da contaminação peritoneal de flora mista na presença de tecido desvitalizado, o que é mais próximo da realidade frequentemente encontrada nas peritonites. É útil para o estudo dos efeitos da sepse e seu tratamento na permeabilidade microvascular sistêmica e pulmonar²⁷.

O desenvolvimento das técnicas microbiológicas ocorrido no final do século XVIII, melhorou a habilidade de cultivar e identificar bactérias através de testes bioquímicos e técnicas similares usadas até os dias de hoje¹⁴. Estas técnicas permitiram avaliar a natureza polimicrobiana das peritonites, semelhante aos modelos de punção cecal²⁷. Também neste estudo, a peritonite se mostrou polimicrobiana onde apenas em cinco animais houve crescimento de *E. coli* exclusivamente²⁷.

Wichterman *et. al.*, demonstraram que a cultura sanguínea de ratos foi positiva para bactérias Gram-positivas (*Streptococcus bovis*) e Gram-negativas (*Bacterioides fragiles*, *E. coli*, *Klebsiella* e *Proteus mirabilis*) 1h após a LPC⁸¹, demonstrando a natureza polimicrobiana deste modelo de sepse⁷. A cultura do lavado peritoneal realizada no presente estudo, demonstrou a natureza polimicrobiana deste modelo de sepse concordante com Wichterman et al., de 1980⁸¹. A LPC é preferível à endotoxina, visto que alguns ratos são resistentes a esta. Também reproduz as fases clínicas da sepse tanto do ponto de vista hemodinâmico, como metabólico⁷.

O número de punções na LPC não parece influenciar diretamente a mortalidade, mas apenas o tempo de evolução⁹⁴, que para a sepse também é um fator importante, pois a brevidade do estudo também impede que outros fatores possam intervir no resultado. Estudos demonstraram presença de bactérias em ducto torácico, quatro minutos após a injeção intra-peritoneal e contagens significativas ocorreram em até dez minutos para avaliações arteriais e 20 minutos para linfáticos, com rápida evolução para bacteremia⁹⁵.

Hollemberg et al., obtiveram em seu estudo, bacteremia seis horas após o procedimento em todos os ratos sépticos, avaliados com crescimento de bactérias Gram-negativas entéricas⁸⁵.

Zanon et al., observaram em culturas positivas, na maioria das vezes de saliva, urina e sangue, que os patógenos mais frequentes foram bacilos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp* e *Acinobacter sp*) em 53% dos casos e coccus gram-positivos em 30,4% (*Staphylococcus Coagulase – negativos* e *Staphylococcus aureus*)⁹⁶. Em 2,8% dos casos foram observados mais de um patógeno e fungos em 1,3%.

Os animais neste estudo apresentaram características típicas, enquadrando-se no conceito de peritonite e sepse conforme os critérios avaliados: piloereção, letargia, cultura do líquido peritoneal, presença de odor fétido na cavidade peritoneal, aderências, peritonite localizada ou difusa, e pela presença de um ou mais abscessos, conforme descrito nos resultados. A ausência de extravasamento de fezes é o mesmo resultado descrito para este tipo de experimento, onde a peritonite apresenta-se através das aderências de alças intestinais e redução da atividade peristáltica. Ascite também não é um achado comumente encontrado⁹⁴.

Otero-Antón et al., avaliando a influência do tamanho da punção cecal na mortalidade, bacteremia, endotoxemia e níveis plasmáticos de TNF- α , constataram que cinco horas após a LPC, havia bacteremia em todos os animais do experimento, independente do tamanho da punção⁹³. *Bacteróides* sp. e aeróbio Gram-negativo eram os micro-organismos predominantes. Endotoxemia, níveis plasmáticos de TNF- α e mortalidade, subiram com o aumento do diâmetro da punção cecal. Stefan et al., compararam o número de punções e apesar de não obterem diferença na mortalidade, encontraram maior incidência de peritonite com maior número de punções⁹⁴. Porém, neste estudo, Stefan et al., não estabeleceram relação direta entre a presença de peritonite e a presença de sepse ou bacteremia significativa⁹⁴. Também mostrou evolução com mortalidade e sepse mesmo sem perfuração, constatando que a translocação também é um fator associado, responsável pela evolução do quadro séptico.

A flora bacteriana na peritonite é mista e variada e todas as bactérias intestinais podem ser encontradas nestes casos⁹⁵. No estudo de Altemeyer et al., a forte evidência da ação cumulativa das bactérias aeróbias e anaeróbias determinou a extensão e a gravidade da sepse⁹⁷. Além disso, os micro-organismos não patogênicos aumentaram a virulência das bactérias associadas a eles. Durham (1897), *apud* Bolton et al., demonstrou a absorção de bactérias através do diafragma entre 30 e 45 minutos⁹⁸.

5.2 REPOSIÇÃO VOLÊMICA

A sepse causa comprometimento precoce do fluxo sanguíneo na microcirculação por meio de edema endotelial e de células vermelhas, que diminui o diâmetro capilar e aumenta a viscosidade e resistência hidráulica. O grande volume de solução cristalóide necessário para reanimação em pacientes nos estágios iniciais da sepse, causa hemodiluição das proteínas plasmáticas com diminuição da pressão coloidosmótica. Isso causa acúmulo de líquido intersticial, que piora as trocas gasosas, diminui a complacência miocárdica, reduz a difusão de oxigênio para os tecidos e contribui para acidose metabólica⁴.

Estudos mostram que pacientes com choque séptico, apresentam grande déficit de fluido e que a depressão miocárdica resultante deste déficit só é revertida em 25 a 40% do total⁴.

O objetivo da reposição volêmica no choque séptico é restaurar a perfusão tissular e normalizar o metabolismo celular⁴. Dentre as opções para reposição, optou-se para este estudo o uso de cristalóides, por ser o tipo de solução mais comumente empregada⁴.

Sob condições ideais, o volume do cristalóide é direcionado e apenas 25% permanece no espaço intravascular, o restante vai para o espaço extravascular. Grandes volumes têm demonstrado causar hemodiluição de proteínas e redução da pressão coloidosmótica, porém, não tem alterado o lactato arterial, mesmo com a solução de ringer lactato⁴.

Alguns estudos sugerem que a reanimação volêmica precoce é benéfica na sepse^{1,6}. A reanimação volêmica, após a utilização da técnica de LPC, apresenta baixos níveis de mortalidade com resposta fisiológica, assemelhando-se a observada na sepse humana⁶. Hollenberg et al., ao reproduzirem sepse por meio de LPC em um modelo animal, constataram um aumento de 24% na sobrevivência dos ratos que receberam reposição volêmica⁹⁹. A ausência de mortalidade neste estudo, em virtude da evolução da sepse, não permite analisar este dado.

Segundo alguns autores, as soluções cristalóides mais comuns: salina isotônica e ringer lactato, são igualmente eficazes no tratamento do choque séptico⁴. Porém, ambas apresentam algumas complicações durante a reposição volêmica na sepse, tais como: aumento da pressão hidrostática, redução da pressão coloidosmótica e aumento da permeabilidade microvascular, entre outras⁴.

A reposição volêmica com solução salina de NaCl 0,9% é eficaz, no entanto, quando grandes volumes de cristalóides são necessários, pode levar à maior incidência de acidose metabólica hiperclorêmica e hipernatremia. Neste caso, o uso de ringer com lactato é preferencial¹¹.

A restauração da volemia na sepse com consequente aumento do débito cardíaco, está associada em geral, a melhora da perfusão sistêmica e regional. No entanto, deve-se monitorizar regionalmente a perfusão tecidual para assegurar que houve restauração do fluxo em todos os órgãos¹⁰⁰.

5.3 PERFUSÃO TECIDUAL

A avaliação de perfusão tecidual se faz fundamental em qualquer avaliação de sepse com ou sem choque séptico. O choque quando ocorre, é caracterizado por uma redução, absoluta ou relativa da oferta de oxigênio aos tecidos, secundário a graves distúrbios perfusionais. O evento final do processo é a disfunção orgânica, principal causa de morte nesta população. Desta forma, a avaliação de perfusão tecidual em pacientes com diagnósticos de choque, está incorporada a novos princípios, que vão além da hipotensão arterial e mais para um estado de inadequada oxigenação tecidual¹⁰¹.

Tendo esta definição como norteadora da avaliação, a perfusão tecidual pode ser conceituada, segundo Silva et al., como o produto do fluxo capilar pelo conteúdo de nutrientes e de oxigênio oferecido aos tecidos¹⁰¹. Portanto duas variáveis são importantes: fluxo e conteúdo de oxigênio. Para este estudo, manteve-se oferta padrão de oxigênio durante o tempo cirúrgico para todos os grupos, sendo que as diferenças ficaram a cargo apenas da doença sepse, deixando o fluxo como a variável a ser estudada diretamente e o conteúdo de oxigênio estudado de forma indireta através da concentração sérica de hemoglobina a despeito das alterações próprias do conteúdo de oxigênio¹⁰¹.

A disfunção hepática pode ser consequência direta da infecção, do choque, da ativação da resposta sistêmica, da insuficiência microcirculatória persistente, ou até mesmo de efeitos colaterais do tratamento instituído. As alterações hepáticas induzidas pela sepse envolvem vários tipos de células hepáticas, como as células de Kupffer, hepatócitos e células do epitélio sinusoidal, além de neutrófilos ativados que juntos vão levar a produção de enzimas com potencial destrutivo, radicais livres e toda a cadeia de resposta que se segue⁴⁹.

A redução de perfusão parece ser o mais importante evento inicializador da disfunção hepática primária. Para isto ocorrer, se faz necessário a redução do fluxo portal, bem como, da artéria hepática. A redução do fluxo da artéria hepática é principalmente causado pelo baixo débito cardíaco. A redução do fluxo portal é provavelmente secundária a redução do fluxo mesentérico secundário à vasoconstrição da artéria

mesentérica. Estes dados mostram que a disfunção hepática ocorre mesmo em ausência de hipoperfusão, sendo este um achado mais tardio em relação ao choque séptico⁴⁹.

O fígado é vulnerável as reduções no aporte de oxigênio causada pela sepse, que por sua vez amplifica a resposta inflamatória culminando com a Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos. No entanto, a reposição volêmica tem sido considerada essencial para restaurar o aporte de oxigênio na região esplâncnica e prevenir o comprometimento cardiovascular. A reposição volêmica precoce resulta em benefícios transitórios em função do dano capilar e da redistribuição do volume infundido para o espaço extravascular. Por meio da monitorização do fluxo hepático é possível controlar a reposição volêmica e evitar a manutenção da hipoperfusão regional, quando variáveis sistêmicas de oxigenação parecem adequadas⁷⁷.

O fluxo hepático semelhante entre os grupos neste estudo é resultante do curto período de baixo fluxo, desde a LPC até o fim do experimento com reposição volêmica precoce amenizando as alterações¹⁰¹, da irregularidade na distribuição do fluxo sanguíneo aos órgãos na sepse⁷⁷ e da deterioração hepática na sepse só ser significativa tardiamente⁴⁹.

A redução do fluxo sanguíneo portal na sepse é bem documentado e pode chegar a 45% do valor basal⁵². Da mesma forma, é bem estudada a resposta a reposição volêmica com aumento acentuado do fluxo sanguíneo portal, porém transitório com uso de solução salina de cloreto de sódio 0,9%⁷⁷. O mesmo ocorre com o uso de solução de ringer lactato⁵².

Há estudos, porém, mostrando aumento do fluxo coronariano e mesentérico-renal com sepse hiperdinâmica, mas mostrando aumento da produção do lactato, achado característico de hipoperfusão, contrastando com o aumento do fluxo¹².

O achado neste estudo, de fluxo renal menor com sepse sem qualquer tratamento e maior na ausência de sepse (grupo controle), evidencia a disfunção renal que ocorre pela hipoperfusão na sepse, atribuída ao dano endotelial, trombose microvascular com alteração nos mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores renais^{46,47}. No início do processo séptico, a hipoperfusão e a lesão inflamatória resultam em insulto isquêmico,

disfunção glomerular e tubular renal^{102,35}. É necessário salientar que o fluxômetro a laser tem uma penetração de até 2 milímetros³⁷, de forma que os resultados obtidos correspondem ao fluxo cortical, sendo que na sepse ocorre uma redistribuição do fluxo favorecendo o fluxo sanguíneo medular. Associado a isto, a ação das endotoxinas levam a diminuição da perfusão renal, mesmo na presença de equilíbrio hemodinâmico relativo³⁵.

Hiltebrand et al., em estudo com animais de experimentação sépticos, observaram diminuição de 44%, no fluxo sanguíneo renal³⁸. Após reposição volêmica, o fluxo sanguíneo no rim voltou aos valores de base, enquanto o aumento do fluxo sanguíneo sistêmico aumentou três vezes, sugerindo perda da auto-regulação vascular renal e comprometimento severo da microcirculação. Um estudo experimental com ratos mostrou que a sepse causou redução no fluxo sanguíneo renal de 25% e o uso de solução de ringer lactato aumentou o fluxo sanguíneo renal⁵².

Williams et al., compararam o efeito do uso de solução de ringer lactato com solução de cloreto de sódio 0,9% e observaram que o uso de solução de cloreto de sódio 0,9 % aumentou o intervalo de tempo até a primeira diurese⁶⁹, provavelmente pelo aumento do cloro sérico que causa diminuição do fluxo sanguíneo renal e filtração glomerular, tendo como consequência a retenção de urina⁴⁷.

Estudos de avaliação do fluxo renal mostraram que mesmo com aumento de até 50% no fluxo renal em sepse hiperdinâmica, estes apresentam aumento da creatinina, sugerindo que há uma redução da taxa de filtração glomerular. Também se ressalta que a rápida evolução da disfunção, em vigência de aumento de fluxo, sugere que a isquemia global não é a única responsável pela fase precoce de desenvolvimento da insuficiência renal¹².

Hirano et al.⁷⁸, ao comparar o efeito da reposição volêmica com solução salina de cloreto de sódio 0,9% com solução de ringer com lactato no rim em ratos, observou menor seqüestro de neutrófilos com o uso de solução salina isotônica 0,9%.

Cervera et al.⁷², descreve aumento do lactato após uso de solução de ringer com lactato, com diminuição da função renal e acidose metabólica.

A diferença significativa encontrada entre o grupo submetido a LPC sem tratamento e o grupo submetido a reposição volêmica com solução salina 0,9% e não com o grupo submetido a reposição com ringer com lactato pode ser justificada pelo lactato resultante da infusão de ringer acrescentado ao aumento do lactato produzido pela falência do metabolismo celular, da glicólise, do piruvato e diminuição da excreção hepática prejudicando a função renal. Pode-se inferir que o aumento do sódio no grupo 2 influenciou através do aumento do hormônio antidiurético, promovendo retenção hídrica, levando ao aumento de filtração glomerular.

Importante ressaltar as variáveis locais, regionais e sistêmicas envolvidas na perfusão tecidual, uma vez que existe distribuição desigual do fluxo durante a instalação da sepse e da reposição volêmica, bem como, nas fases mais tardias da sepse, o que explica a ausência de correlação entre os fluxos sanguíneos hepático e renal¹⁰¹. Porém, estudos com reposição maciça no choque, não encontraram diferenças entre solução salina isotônica e o ringer lactato, com o hematócrito, proteínas ou mesmo parâmetros hemodinâmicos que possam influir na perfusão⁷².

5.4 HEMOGLOBINA

A avaliação da hemoglobina, como já citado previamente, faz-se importante por ser um condutor de oxigênio. A alteração neste caso, pode ser feita diretamente por alteração da hemoglobina, como indiretamente pelo hematócrito, ou mesmo pela hemácia em sua forma.

A dosagem da hemoglobina teve resultado semelhante entre os grupos, resultante do curto intervalo de tempo entre a indução da sepse e a coleta de sangue para dosagem da mesma. Algumas inferências porém, podem e devem ser feitas a respeito das dosagens absolutas, onde a ausência de sepse mostrou maior hemoglobina, enquanto a menor ficou a cargo da reposição com ringer lactato, porém, sem diferença significativa.

Estudos em ratos com sepse têm demonstrado, ora redução direta da dosagem da hemoglobina⁵², ora indireta através de alterações da deformidade das hemácias⁵¹, ora nem diferença mostram³¹.

Avaliações da reposição volêmica em um modelo experimental de sepse, têm mostrado aumento da hemoglobina após a indução da sepse e diminuição transitória após a reposição volêmica, sugerindo aumento da permeabilidade vascular na sepse com redistribuição do líquido infundido e manutenção da hipovolemia⁵². Outro autor, na análise sanguínea de ratos submetidos a um modelo animal de sepse não letal, induzida por punção e ligadura cecal, constatou diminuição de hemoglobina⁵³.

5.5 HEMATÓCRITO

Baskurt et al., ao avaliarem a deformidade das células vermelhas, usaram três grupos: controle (não submetido a nenhum procedimento), laparotomia e laparotomia associado a LPC⁵⁰. Ao dosarem a hemoglobina, a mesma apresentou valores superiores ao controle em todos os grupos, sugerindo hemoconcentração. Baskurt mostrou também aumento do hematócrito e redução das hemácias após seis horas sem diferença significativa e após dezoito horas com diferenças importantes. Neste estudo, Baskurt encontrou aumento da deformidade das hemácias na sepse após seis horas.

Remick et al., mostraram a ocorrência de queda das hemácias em LPC, em quatro horas com posterior estabilização¹⁰³.

O estudo de Svensén et al., assim como os estudos citados, mostram um comportamento dinâmico com reposição volêmica⁷⁹. Svensén mostrou aumento e redução intercalados em vários parâmetros. Esta avaliação pode sugerir que este estudo teve as alterações limitadas pela brevidade do procedimento entre o início e o fim do mesmo.

Lam et al., não encontraram alterações da dosagem de hemoglobina, como neste estudo, porém houveram manifestações microvasculares como: redução da densidade de hemácias nos capilares perfundidos, aumento da heterogeneidade das hemácias nos capilares e aumento do espaço entre os capilares (edema?).

A dosagem do hematócrito não apresentou diferença estatística entre os grupos. Apesar de não haver diferença estatística é sensível a diferença absoluta nos níveis de hematócrito entre os grupos 2 e 3, que apresentaram

reposição volêmica e ficaram com o menor hematócrito comparados ao grupo 4, o grupo controle ficou com o maior hematócrito.

O tempo não parece ter sido aqui uma influência importante, uma vez que há estudos comprovando alterações em até três horas⁷⁹. Ficando portanto, apenas a hemodiluição ocorrida nos grupos 2 e 3 pela reposição volêmica, o grande responsável pelas diferenças entre os níveis de hematócrito, embora não haja diferença significativa. Argumento este usado nos estudos de Baskurt et al., que teve aumento do hematócrito quando comparado ao grupo controle provavelmente por hemoconcentração, uma vez que não teve alteração da concentração da hemoglobina corpuscular⁵⁰.

5.6 LEUCÓCITOS

A leucopenia encontrada neste estudo é condizente com os trabalhos a seguir, e em tempos diferentes como 2h⁴⁴, 6h⁵⁰, 18h⁵⁰, 24h⁵³. O mesmo achado de leucopenia na sepse sem reposição volêmica também é encontrado em outros estudos, embora mais proeminente com um intervalo de tempo maior⁵⁰. Um modelo experimental com indução de peritonite por LPC seguida de reanimação volêmica determinou mortalidade de 90% dos ratos, com diminuição no número de leucócitos¹⁰³.

Ao analisarem a deformabilidade das células vermelhas, Baskurt et al., usaram três grupos: controle (não submetido a nenhum procedimento), laparotomia e laparotomia associado a LPC, e encontraram diminuição no número de leucócitos no grupo com sepse, sendo mais proeminente após 18h, porem houve aumento de leucócitos em seis horas.

Com o objetivo de avaliar a ausência de letalidade pós LPC em um estudo experimental, Ebong et al., analisaram o número de leucócitos e encontraram redução em 24h pós LPC as custas dos neutrófilos, monócitos e linfócitos⁵³. Já Law et al., observaram leucopenia 2h após indução da sepse em ratos e a mesma permaneceu por 24h⁴⁴. Estudos de Araújo Filho et al., mostraram que os leucócitos apresentaram elevação no grupo controle sem sepse⁵⁴.

O achado de diferença entre a presença e ausência de sepse, sem relação aparente com a reposição volêmica, pode ser explicado pelo pouco

tempo de choque e reposição volêmica precoce, mas de forma subjetiva, pois os números encontrados não permitem conclusões precisas e os achados divergem da literatura, como no estudo de Araújo Filho et al.⁵⁴ Este observou aumento no número de leucócitos em ratos, submetidos à laparotomia associada a LPC e reposição volêmica com solução de ringer lactato, quando comparados aos grupos submetidos a laparotomia isolada⁵⁴.

5.7 NEUTRÓFILOS

Dentro da avaliação dos leucócitos é importante avaliar os neutrófilos, tendo em vista sua importância na resposta inflamatória do hospedeiro, como já mencionado no capítulo referente a revisão de literatura.

A dosagem dos segmentados não apresentou diferença significativa entre os grupos. Outros autores, na análise sanguínea de ratos submetidos a um modelo animal de sepse não letal, induzida por LPC, constataram diminuição dos neutrófilos. A indução de peritonite por LPC seguida de reanimação volêmica mostrou diminuição de neutrófilos^{103,53}. Já, Araújo Filho et al., ao compararem laparotomia com laparotomia associada a, LPC e reposição volêmica em ratos tiveram um aumento no número de neutrófilos.

Estudos com o mesmo modelo de sepse normovolêmico, apesar de não mostrarem diferença da hemoglobina, apresentaram linfopenia de até 60% e neutropenia de até 80%³¹. Esta neutropenia ocorre de forma tão precoce, quanto a redução de hemácias e de linfócitos em 04 horas¹⁰³.

A neutropenia não tem sido um achado constante na literatura. Araújo Filho mostra claro aumento de neutrófilos em até 50% e de leucócitos 30%, associado a uma queda de eosinófilos de 75% e linfócitos 70%⁵⁴. Já, Kreimer et al., mostraram não haver diferenças entre animais com sepse, com e sem reposição e em animais sem agressão alguma¹⁰⁴.

Apesar dos estudos serem controversos em relação a contagem absoluta de neutrófilos, a sua função é muito bem esclarecida e pode explicar outros achados na resposta a sepse. Klebanoff et al., mostraram *in vitro*, que o neutrófilo ativado pelo TNF- α tem aumento da fagocitose em até 60 minutos, com aumento da degranulação e liberação de radicais de peróxido¹⁰⁵.

O efeito de ativação mostrado por Klebanoff et al., pode ser o responsável por sua ativação, promovendo aderências sobre as células endoteliais e tornando-se uma das prováveis causas de redução de fluxo por lesão microvascular na sepse¹⁰⁵. O mesmo processo de lesão endotelial por neutrófilos foi observado por Smedly et al., a partir de duas horas de estímulo séptico¹⁰⁶. Seu estudo deu principal suporte para a teoria de que a lesão endotelial é mediada por neutrófilos e pode ocorrer por vários mecanismos e de forma indireta pode ser co-responsável por um importante papel na gênese da lesão vascular na sepse.

5.8 LINFÓCITOS

Quando comparados, os grupos não apresentaram diferença significativa na dosagem dos linfócitos. Em um estudo de Ebong et al., a análise sanguínea de ratos submetidos a um modelo animal de sepse não letal, induzida por punção e ligadura cecal, constatou-se diminuição dos linfócitos ($5,1 \pm 0,4 \times 10^3$)⁵³. O mesmo foi constatado por outros autores¹⁰⁶. A diminuição de linfócitos também foi evidente em um estudo experimental de Araujo Filho et al., quando compararam laparotomia com laparotomia associado a LPC e a reposição volêmica⁵⁴.

Os polimorfonucleares são importantes na resposta inflamatória, a marcante redução de linfócitos, observada por Ebong et al., em sua revisão, representa diminuição da produção de novas células e o aumento da necessidade de repor os linfócitos apoptóticos dos tecidos periféricos 24h pós LPC⁵³.

5.9 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS

Os grupos 2 e 3, submetidos a reposição volêmica apresentaram diferença estatística quando comparados aos grupos 1 e 4. A diminuição de proteínas plasmáticas totais nos grupos 2 e 3, pode ser explicada pela reposição volêmica que em indivíduos com infecção ou dano severo leva ao aumento do volume plasmático, com hipoalbuminemia dilucional⁵⁷.

A hipoalbuminemia que ocorre na sepse de forma significativa e precoce de até três horas⁸¹, ainda não totalmente explicada e o curso da albumina após uma lesão-estímulo é incerto e não muito bem documentado⁵⁸.

A hipoalbuminemia pode ser explicada parcialmente, pelo efluxo de plasma do intravascular que ocorre na sepse de forma precoce⁵⁸. Também se destaca o papel do retorno linfático na distribuição das proteínas. A diluição também está envolvida^{58,70}.

O retorno a níveis normais não foi avaliado neste estudo por estar fora de propósito, mas é descrito na dependência da retomada de produção, ocorrendo em até dez dias⁵⁸.

Na fase tardia da sepse, a albumina está preferencialmente localizada no espaço extravascular e é perdida pelo organismo pelo balanço negativo entre síntese e catabolismo⁵⁸. Silva et al., em estudo que avaliava o perfil eletroforético das proteínas em crianças com perfil compatível com processo inflamatório, encontraram a concentração de proteínas plasmáticas em 7,0 g/dL, valor dentro da média de referência, provavelmente pela compensação entre as frações, uma vez que a concentração de albumina está diminuída e das globulinas está aumentada⁵⁷.

As alterações observadas nas proteínas de fase aguda têm o objetivo de restaurar a homeostase após uma lesão, necrose tecidual ou infecções e embora o padrão de resposta das proteínas individuais possa diferir em relação ao tipo de doença, as alterações observadas nas concentrações plasmáticas são geralmente indicadoras de infecção⁵⁷.

5.10 TNF- α

Na última década inúmeros marcadores têm sido sugeridos para o diagnóstico precoce da sepse, dentre os quais está a dosagem sérica do TNF- α ⁹¹, que é detectável em 54% dos pacientes com sepse. Frequentemente relacionado a sepse, o TNF- α atinge o pico plasmático em até quatro horas¹⁶, embora aumentos consideráveis possam ser observados em até duas horas¹⁰³. O aumento precoce (01 a 4h após LPC) das citocinas no soro parece estar associado a ativação de polimorfonucleares

peritoneais^{7,103}. O aumento do TNF- α parece ocorrer independente do número de perfurações em estudos com LPC⁹⁵, assim como, parece ser independente do número de bactérias nas culturas, embora o nível de outras citocinas e principalmente de TNF- α pareça ter correlação direta com a gravidade da infecção e da sepse⁷. Porém, a grande dificuldade na análise dos níveis séricos de TNF- α está em se estabelecer o momento exato do início da sepse⁷. Ashare et al., mostraram picos de TNF- α no fígado, muito antes dos picos séricos, mostrando que a inflamação começa antes da elevação do TNF- α sérico⁷. A presença precoce do TNF- α no fígado é seguida de marcante produção de agentes mediadores anti-inflamatórios e consequente transição para um “estado” anti-inflamatório⁷.

A presença de bactérias nos tecidos ativa a produção de mediadores inflamatórios, levando o macrófago a produzir TNF- α e IL-1. Estes mediadores vão ativar as células endoteliais e os neutrófilos, causando repercussões sistêmicas³⁴.

Alguns minutos após ocorrer a ativação pelo TNF- α , ocorre a marginação dos monócitos e neutrófilos com aumento da adesividade endotelial e promovendo a formação de agregados de neutrófilos e migração de monócitos e neutrófilos para o espaço extravascular³⁴.

Quando avaliada a média dos grupos com relação ao TNF- α , não houve diferença estatística em função da variação dos dados, dando grande amplitude de desvio padrão. Porém a média no grupo 4 foi bem menor que nos grupos 1 e 2.

O aumento no TNF- α foi proporcional a diminuição do número de leucócitos, refletindo uma maior relação com a atividade inflamatória. Os títulos de TNF- α após LPC são baixos e refletem a dinâmica da sepse em humanos¹. Em um estudo, Ebong et al., ao obterem títulos de TNF- α plasmático baixo (< 70 pg/mL), ou seja, presente em baixas concentrações (29 ± 9 pg/mL) relatam que o TNF- α é produzido precocemente na resposta inflamatória e que o pico do TNF- α deve ter ocorrido antes da mensuração⁵³. Títulos baixos de TNF- α também foram observados por Remick et al., que relataram aumento gradual do TNF- α oito horas após LPC¹⁰³.

Ao avaliarem os efeitos da LPC associado a reposição volêmica com solução salina de cloreto de sódio 0,9%, na liberação das citocinas nos

estágios iniciais da sepse Ayala A et al., observaram aumento significativo do TNF- α uma hora após LPC, diminuindo a seguir a níveis não detectáveis¹⁰⁷. No entanto, o uso de soluções cristalóides isotônicas não parece ter efeito na modulação da liberação do TNF- α induzida pelo choque¹⁰⁸. Gurfinkel et al., relataram níveis de TNF elevados mesmo após tratamento com solução cristalóide isotônica¹⁰⁸.

A relação inversa encontrada entre o TNF- α e o número de leucócitos condiz com o trabalho de Law et al., em que a sepse causa leucopenia e aumento do TNF- α , havendo relação entre os dois⁴⁴.

Alguns fatores podem interferir na interpretação do TNF- α : a) o teste usado para detectar a presença de material imunologicamente reativo pode estar ou não biologicamente ativo; b) receptores solúveis circulantes ou inibidores podem se ligar a citocina e neutralizar sua atividade biológica e podem ou não interferir no estudo imunológico; c) outros fatores plasmáticos podem interferir com o teste das citocinas¹³. Muitos estudos clínicos em pacientes sépticos relataram pequena elevação ou níveis indetectáveis de TNF- α ²⁶.

Araujo Filho et al., avaliaram a resposta do hospedeiro quanto a citocinas, em ratos wistar submetidos à laparotomia após LPC, 30 minutos após o procedimento, e obtiveram aumento no TNF- α dosado no líquido intraperitoneal (por ELISA)⁵⁴. A peritonite bacteriana resulta em baixos níveis séricos de resposta do TNF- α com pico menor que 500 unidades por mL. Bagby et al., com base em seus estudos prévios consideraram que o TNF- α deve ser produzido em grande quantidade, mas fica confinado ao sítio de infecção¹⁰⁹. Com base nestas informações e em um experimento que avaliou o TNF- α no lavado do líquido peritoneal, observaram o pico de TNF- α com duas horas em torno de 1000-2000 unidades e retorno a baixos níveis em seis horas. O TNF- α pode ter efeito benéfico ou deletério no hospedeiro durante a infecção. O que predominará será determinado pela condição subjacente do hospedeiro, a localização e o tipo de infecção e a magnitude da resposta do hospedeiro. Como muitas infecções são localizadas, o TNF- α deve frequentemente ter ação sinérgica com outros mediadores iniciando a resposta do hospedeiro no sítio de infecção.

Em estudo de Cannon et al., os níveis de TNF- α em pacientes sépticos foi de 119 + ou – 30 pg/mL e se relacionou com a severidade da doença¹¹⁰, enquanto pacientes saudáveis apresentaram títulos de 73 + ou – 8pg/ml. O mesmo foi encontrado por Pinsky et al. ao avaliarem os níveis de citocinas em pacientes com choque séptico, sugerindo que o TNF- α foi produzido em excesso, e ou, pouco metabolizado¹⁸.

5.11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reanimação na sepse é um processo contínuo, enquanto este estudo mostrou um protocolo pontual na reposição volêmica, sem intervenções adicionais. O curto intervalo de tempo de observação tornou difícil avaliar o impacto do regime de reanimação volêmica, no desenvolvimento de disfunção de múltiplos órgãos e sepse.

O curto intervalo de tempo entre a indução da sepse e a coleta de sangue determinou que os níveis semelhantes de hemoglobina, hematócrito, linfócitos e neutrófilos segmentados, não tenham se diferenciado.

As alterações anatomopatológicas encontradas no fígado, no pulmão e no rim são inespecíficas e podem ser explicadas pelo trauma cirúrgico, pelo uso de anestésicos. Um período maior de observação talvez permitisse o desenvolvimento de alterações mais específicas, porém ,também poderia levar a um aumento da mortalidade.

A partir deste estudo e do levantamento bibliográfico realizado, podemos inferir que o sucesso no tratamento da sepse será adquirido a partir da reformulação de seu conceito, resposta do hospedeiro à infecção para uma enfermidade específica, caracterizada por patógenos individuais e reconhecimento da vias de resposta do hospedeiro. Enquanto se perguntar sobre a fisiopatologia da sepse, as respostas estarão mudando e estimulando novos conhecimentos¹⁴.

6 CONCLUSÕES

Nas condições do experimento a análise dos resultados permite concluir que:

- a) O aumento no TNF na LPC é inversamente proporcional ao número de leucócitos.
- b) Os leucócitos diminuem de forma significativa na LPC não tratada com reposição volêmica com solução cristalóide isotônica.
- c) A reposição volêmica ocasiona diminuição das proteínas plasmáticas totais por diluição.
- d) Não há alteração do fluxo sanguíneo hepático 6 horas após sepse abdominal causada por LPC, mesmo após reposição volêmica.
- e) Na sepse abdominal, 6 horas após LPC, ocorre queda significativa do fluxo sanguíneo renal.
- f) O fluxo sanguíneo renal, na sepse abdominal, 6 horas após LPC, tem aumento significativo com a reposição volêmica com solução salina de cloreto de sódio 0,9%.

REFERÊNCIAS

1. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(4):460-7.
2. Sales-Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, et al. Sepse Brasil Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *RBTI* 2006;18(1):9-17.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinski MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; 29:1303-10.
4. Hollenberg SM, Ahrens TS, Annane D, Astiz ME, Chalfin DB, Dasta JF, et al. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients, 2004 update. *Crit Care Med.* 2004;32:1928-48.
5. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101: 1644-55.
6. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Reeler J, Muzzin A, Knoblich B, *et al.* Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001; 345(19): 1368-77.
7. Ashare Alix, Powers LS, Butler NS, Doerschug KC, Monick MM, Hunninghake GW. Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *AJP-Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288:L633-L640.

8. Salles MJC, Sprovieri SRS, Bedrikow R, Pereira AC, Cardenut SL, Azevedo PRC, et al. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/ sepsis_revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. Rev Assoc Med Bras. 1999; 45(1): 82-92.
9. Parrillo JE. Pathogenic Mechanisms of Disease. N Engl J Med. 1993;328(20):1471-77.
10. Knobel E, Knobel M, Akamine N, Jr Fernandes CJ. Alterações cardiocirculatórias na sepsis. RSCESP, 1998;3:389-99. Disponível em <http://200.220.14.51/revistasocesp/edicoes/volume08/pdf/n03.pdf>. [acesso na internet em 01/04/2009].
11. Lobo SMA, Rezende E, Mendes CL, Réa-Neto A, David CM, Dias FS et al. Consenso Brasileiro de Monitorização e Suporte Hemodinâmico. RBTI. 2006;18(2):161-76.
12. Di Giandomasso D, May CN, Bellomo R. Vital organ blood flow during hyperdynamic sepsis. CHEST. 2003; 124 (3): 1053-59.
13. Silva E, Othello J, Sogayar ACB. Consenso Brasileiro de Sepsis: Disfunção de Múltiplos Órgãos. Disponível em : <http://www.einstein.br/sepsis/pdf/2.htm>. [acesso na internet em 31/03/2009].
14. Baron RM, Baron MJ, Perella MA. Pathobiology of Sepsis. Are we still asking the same questions? AM J Respir Cell Mol Biol. 2006;34:129-34.
15. Tracey KJ, Beutler B, Lowey SF, Meryweather J, Wolpe S, Milsark IW, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science. 1986; 234(4775):470-4.
16. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med. 1993;119(8): 771-78.

17. Stack AM, Saladino RA, Thompson C, Sattler F, Weiner DL, Parsonnet J, et al. Failure of prophylactic and therapeutic use of a murine anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody in Escherichia coli sepsis in the rabbit. *Crit Care Med*. 1995; 23(9): 1512-18.
18. Pinsky MR, Vicent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock: Relation to multiple-system organ failure and mortality. *CHEST*. 1993; 103(2): 565-74.
19. Majno G. The ancient riddle of sepsis. *J Infec Dis*. 1991; 163: 937- 45.
20. Hurlbert RE. Chapter 1: a brief history of microbiology. *Microbiology* 101/102. 1999; [acesso em 26/01/2008]. Disponível em <http://www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/pages/Chap1.html>.
21. Osler W. Septicemia and Pyaemia. In: Adams LBJr, editor. *The principles and practice of medicine*. New York: D. Apleton and Co.; 1892. p.160-165. Disponível em <http://mcgovern.library.tmc.edu/data/www/html/people/osler/PPM4th/O P400093.htm>. [acesso em 05/02/2008].
22. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003; 348(16): 1546-54. Beal AL, Cerra FB .Multiple failure organ syndrome in the 1990s: systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA*. 1994; 271: 226-33.
23. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al . 2001. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003; 31(4):1250-56.
24. Jacobi J. Pathophysiology of sepsis. *AJHP*. 2002; 59(4 Suppl 1):3-8.
25. Hill AG, Hill GL. Metabolic response to severe injury. *Br J Surg*. 1998;85:884-90.

26. Hotchkiss RS, Irene EK. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 348(2): 138-50.
27. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*. 1990; 49: 186-96.
28. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BP, Tinsley KW, Cobb JP, Matrischak EM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1999; 27: 1230-51.
29. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol*. 2002; 168: 2493-500.
30. Silva E, Friedman G, Gutierrez G. Perfusão Tecidual na Sepsis: Sistêmica e Regional. In: Silva E, Friedman G. Sepsis. São Paulo: Editora Atheneu; 1999. p. 199-219.
31. Lam C, Tyml Karel, Martin C, Sibbald W. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J Clin Invest*. 2004;94:2077-83.
32. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*. 2001; 345(8): 588-94.
33. Hinshaw, LB. Sepsis /septic shock: Participation of the microcirculation: An abbreviated review. *Crit Care Med*. 1996; 24(6):1072-78.
34. Dixon B. The role of microvascular thrombosis in sepsis. *Anaesth Intensive Care*. 2004; 32(5): 619-29.
35. Almeida SW, Campos HA, Schor N. Endotoxina se rim. *Rev Port Nefrol Hipert*. 2006; 20(3): 173-89.
36. Roguin A. Christian Johhan Doppler: the man behind the effect. *BR J Radiol*. 2002; 75:615-19.

37. Perfusion Measurement: Technology for Tissue Perfusion Studies p. 47-56. Disponível em: http://www.transonic.com/Research_Home/Products_Laboratory_Research/BLF_pages_47-56.pdf . [acesso em 15/03/09].
38. Hildebrand LB, Krejci V, Banic A, Erni D, Wheatley A, Sigurdsson GH. Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. Crit Care Med. 2000;28(9):3233-41.
39. Wichert P, Wiegers U, Huck A, Eckert P, Riesner K. Altered Metabolism of Phospholipids in the Lung of Rats with Peritonitis. Res. Exp. Med. 1978; 172:223-29.
40. Neto AR. Manifestações Clínicas da Sepses. In: Silva E, Friedman G, editores. Sepses. São Paulo: Editora Atheneu; 1999. p. 103-118.
41. Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SL. Evidence for Tumor Necrosis Factor-induced Pulmonary Microvascular Injury After Intestinal Ischemia- Reperfusion Injury. Ann Surg. 1990;212(6):694-700.
42. Esrig BC, Fulton RL. Sepsis, Resuscitated Hemorrhagic Shock and Shock Lung: An Experimental Correlation. Ann Surg. 1975;182(3):218-26.
43. Husain AN, Kumar V. Pulmão. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins e Cotran: Patologia- Bases Patológicas das Doenças. 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 747-812.
44. Law WR, Valli VE, Conlon BA. Therapeutic potential for transient inhibition of adenosine deaminase in systemic inflammatory response syndrome. Crit Care Med. 2003;31(5):1475-81.
45. Thijs A, Thijs LG. Pathogenesis of renal failure in sepsis. Kidney International 1998; 53 Suppl 66: 34 – 37.

46. Krisztopik RJ, Bentley FR, Spain DA, Wilson MA, Garrison N. Free radical scavenging by lazaroids improves renal blood flow during sepsis. *Surgery*. 1996; 120: 657-62.
47. Wilcox CS. Regulation of Renal Blood Flow by Plasma Chlorid. *J Clin Invest*. 1983;71:726-35.
48. Alpers EA. Rim. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran: Patologia- Bases Patológicas da Doenças. 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 999-1066.
49. Dhainaut J F, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. Hepatic response to sepsis: Interecton between coagulation and inflamoty process. *Crit Care Med*. 2001;29(7 Suppl):S42-45.
50. Baskurt OK, Gelmont D, Meiselman HJ. Red Blood Cell Deformability in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157:421-27.
51. Kempe SD, Akel A, Lang PA, Hermle T, Biswas R, Muresanu J, et al. Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med*. 2007;85:273-81.
52. Garrido AG, Cruz Jr RJ, Poli de Figueiredo LF, Cruz RJ Jr, Rocha e Silva M. Small volume of hypertonic saline as the initial fluid replacement in experimental hypodynamic sepsis. *Crit Care* [periódico na internet]. 2006 Apr 10(6): [9p.] Disponível em: <http://ccforum.com/content/10/2/R62>. [Acesso em 05/04/2008];
53. Ebong SA, Call DR, Bolgos G, Newcomb DE, Granger JL, O'Reilly M, et al. Immunopathologic Responses to Non-Lethal Sepsis. *Shock*, 1999;12(2):118-26.
54. Araújo Filho I, Honorato Sobrinho AA, Rego ACM, Garcia ACMA, Fernandes DP, Cruz TM, et al. Influence of laparoscopy and laparotomy on gasometry, leukocytes and cytokines in a rat abdominal sepsis model. *Acta Cir Bras* [serial on the Internet]. 2006 Mar- Apr; 21(2). Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>.

55. Vincent J-L, Yagushi A, Pradier O. Platelet function in sepsis. *Crit Care Med.* 2002; 30 (Suppl5): 313-17.
56. Zeerleder S, Hack E, Willemin WA. Disseminated Intravascular Coagulation in Sepsis. *Chest.* 2005; 128(4): 2864- 75.
57. e Silva DGKC, Teodoro GM, de Sena LV, de Souza ZM, Rezende AA. Perfil Eletroforético de Proteínas Plasmáticas: Estudo em Crianças Atendidas no Hospital de Pediatria-Hosped/ UFRN da Cidade de Natal-RN. *RBAC.* 2005; 37(4): 239-42.
58. Ruot B, Papet I, Béchereau F, Denis P, Buffière C, Gimonet J, et al. Increased albumin plasma efflux contributes to hypoalbuminemia only during early phase of sepsis in rats. *AM J Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284:R707-713.
59. Beutler B, Cerami A. The Endogenous Mediator of Endotoxic Shock. *J Clin Res.* 1987; 35(3)192-97.
60. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer AS, Wenzel WJ, et al. Human Tumor necrosis Factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1985; 260: 2345-54.
61. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular.* 4thed. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 2003. p. 235-269.
62. Beutler B, et al. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature,* 1985. 316(6028): 552-4.
63. Beutler B, Milsark IW, Cerami A. Passive immunization against cachectin / tumor necrosis factor protects mice from the lethal effect of endotoxin. *Science* 1985; 229: 869-71.

64. Tremblay LN, Rizoli SB, Brenneman FD. Advances in fluid resuscitation of hemorrhagic shock. *Can J Surg*. 2001 Jul ; 44(3):172-179.
65. Colégio Americano de Cirurgiões. Suporte Avançado de Vida no Trauma para Médicos: ATLS 7th Ed. Chicago, IL: American College of Surgeons; 2004:88.
66. Mathes DD, Morell RC, Rohr MS. Dilutional acidosis: is it a real clinical entity? *Anesthesiology*. 1997;86(2):501-503.
67. Tanaka M, Ishikawa T, Nishikawa T, Goto K, Sato S. Influence of Acidosis on Cardiotoxic Effects of Milrinone. *Anesthesiology*. 1998; 88(3): 725-34.
68. Waters JH, Berstein CA. Dilutional Acidosis following Hetastarch or Albumin in Healthy Volunteers. *Anesthesiology*. 2000;93:1184-7.
69. Williams EL, Hildebrand KL, McCormick SA, Bedel MJ. The Effect of Intravenous Lactated Ringer's Solution versus 0,9% Sodium Chloride Solution on Serum Osmolarity in Human Volunteers. *Anesth Analg*. 1999;88:999-1003.
70. Scheingraber S, Rehm M, Sehmisch C, Finsterer U. Rapid Saline Infusion Produces Hyperchloremic Acidosis in Patients Undergoing Gynecologic Surgery. *Anesthesiology*. 1999; 90: 1265-70.
71. Healey MA, Davis RE, Liu FC, Loomis WH, Hoyt DB. Lactated Ringer's Is Superior to Normal Saline in a Model of Massive Hemorrhage and Resuscitation. *J Trauma*. 1998;45(5):894-98.
72. Cervera AL, Moss G. Dilutional re-expansion with crystalloid after massive hemorrhage: saline versus balanced electrolyte solution for maintenance of normal blood volume and arterial pH. *J Trauma*. 1975;15(6):498-503.

73. Ho AMH, Karmakar MK, Contardi LH, Ng SSW, Hewson JR. Excessive Use of Normal Saline in Managing Traumatized Patients in Shock: A Preventable Contributor to Acidosis. *J Trauma*. 2001;51(1):173-77.
74. Schierhout G, Roberts I. Fluid resuscitation with colloid or crystalloid solutions in critically ill patients: a systematic review of randomized trial. *Br Med J*. 1998;316:961-64.
75. Choi PT-L, Yip G, Quinonez LG, Cook DJ. Crystalloids VS. Colloids in fluid resuscitation: A systematic review. *Crit Care Med*. 1999; 27(1): 200-7.
76. Deb S, Sun L, Martin B, Talens E, Burris D, Kaufmann C, et al. Lactated Ringer's Solution and Hetastarch but Not Plasma Resuscitation after Rat Hemorrhagic Shock Is Associated with Immediate Lung Apoptosis by the Up-regulation of the Bax Protein. *J Trauma*. 2000;49(1) :47-55.
77. Rahal L, Garrido AG, Cruz Jr RJ, Rocha e Silva M, Poli de Figueiredo LF. Systemic and regional hemodynamic effects of enalaprilat infusion in experimental normotensive sepsis. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:1205-15.
78. Hirano ES, Mantovani M, Morandin RC, de Brito J, Pavani L. Isquemia e reperfusão hepática total após estado de choque hemorrágico controlado com uso de diferentes soluções: efeitos no sequestro de neutrófilos no rim de ratos. *Acta Cir Bras*. 2006;21(1):31-37.
79. Svensén CH, Clifton B, Brauer KI, Olsson J, Uchida T, Traber DL, et al. Sepsis Produced by Pseudomonas Bacteremia Does Not Alter Plasma Volume Expansion After 0,9% Saline Infusion in Sheep. *Anesth Analg*. 2005;101:835-42.
80. Sharp PE, La Regina MC. The laboratory rat. Washington CRC Press. 1998.p. 103.

81. Wichterman KA, Baue AE, Chandry IH. Sepsis and septic shock_ A review of laboratory models and a proposal. J Surs Res. 1980; 28: 189-281.
82. Freitas JCOC, Medeiros AC, Sales VSF. Proteção pela glucana em modelo experimental de sepse. Acta Cir. Bras. 2004; 19(3):296-307.
83. Biondo-Simões MLP, Greca FH, Bryk Junior A, Komatsu MCG, Bittencourt FO, Greca LM. Influência da peritonite sobre a síntese de colágeno de cólon distal: estudo experimental em ratos. Acta Cir Bras. 2000; (supl 3): 69-73.
84. Griffith Jr JQ. The rat in laboratory investigation 2nd ed. New York: Hafner Publishing Company; 1949. 20p.
85. Hollenberg SM, Dumasius A, Easington C; Colilla AS, Neumann A, Parrillo JE. Characterization of a Hyperdynamic Murine Model of Ressuscitated Sepsis Using Echocardiography. Am J Resp Crit Care Med. 2001; 164(5): 891-95.
86. Sebben GA, Rocha SL, Von Bahten LC, Biondo-Simões MLP, Ramos FHA, Pilonetto M, et al. Infection on the meshes implantation área in the abdominal wall of rats with induced bacterial peritonitis. Acta Cir Bras. 2006; 21(3): 155-60.
87. Tramont R, Carvalho ROM, Farias DC, Serafim JDM, Ortellado DK, D'Acampora, AJ. Alterações da mucosa intestinal em ratos. Estudo morfométrico em três diferentes tratamentos após indução experimental de sepse abdominal aguda. Acta Cir Bras. 2004; 19(2): 120-25.
88. Bancroft JD, Steves A. Theory and practice of histological techniques. 2nd ed. New York: Churchill Livingstoned;1982.p.
89. Beesley RA. Daniel PM. A simple metod for preparing serial blocks of tissue. J Clin. Patol. 1986; 9: 267-88.

90. Vizzoto Jr. AO, Noronha L, Scheffel DLH, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e pós operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. J Bras Patol Med Lab. 2003; 39(2): 143-49.
91. Carvalho PRA, Trotta EA. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. J Pediatr. 2003;79(Supl 2):S195-S204.
92. Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. Bioestatística. 2nd edição (EPU). São Paulo, 1981. p. 133- 192.
93. Otero-Antón E, Gonzáles-Quintela A, López-Soto A, et al. Cecal ligation and puncture in the rat: Influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha level. Eur Surg Res. 2001; 33: 77-79.
94. Stefan M, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huster N, et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis[Basic Science Aspects]. Shock. 2004; 21(6):505-12.
95. Steinberg BG, Goldblatt H. Studies on Peritonitis: Passage of Bacteria From The Peritoneal Cavity into Lymph And Blood. Arch Intern Med. 1927;32:449-55.
96. Zanon F, et al. Sepsis na Unidade de Terapia Intensiva: Etiologias, Fatores Prognósticos e Mortalidade. RBTI. 2008;20(2):128-34.
97. Altemeier, WA. The pathogenicity of the bacteria of the appendicitis peritonitis. Surgery. 1942; 374-84.
98. Bolton C. Absorption from peritoneal cavity. J Pathol Bacteriol. 1921; 24:429-45.
99. Hollenberg S, Brousard M, Osman J, Parrilo JE. Increased Microvascular Reactivity and Improved Mortality in Septic Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase. Circ Res. 2000; 86(7) 774-78.

100. Silva E. Perfusão Esplâncnica e Disfunção Gastrintestinal. In: Silva E, Friedman G, editores. Sepsis. São Paulo: Editora Atheneu; 1999. p. 171-95.
101. Silva E, Garrido G, Assunção MSC. Avaliação da Perfusão Tecidual no Choque. Medicina. Ribeirão Preto, 2001;34:27-35.
102. Wardle EN. Acute Renal Failure an Multiorgan failure. Nephron.1994;66:380-85.
103. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two model of sepsis: lipopolysacharide vs cecal ligation and puncture.Shock.2000;13(2):110-16.
104. Kreimer F, Aguiar JLA, Castro CMMB, Lacerda CM, Reis T, Lisboa Jr F. Resposta Terapêutica e inflamatória de ratos com peritonite secundária submetidos ao uso tópico de ampicilina/ sulbactam. Acta Cir Brás. 2005;20(supl 1): 31-34.
105. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, et al. Stimulation of Neutrophils by Tumor Necrosis Factor. J Immunol. 1986;136(11):4220-25.
106. Smedly LA, Tonnessen MG, Sandhaus RA, Hasielt C, Guthrie LA, Jonston RB, et al. Neutrophil-mediated Injury to Endothelial Cells. Enhancement by Endotoxin and Essential Role of Neutrophil Elastase. J Clin Invest.1986;77:1233-43.
107. Ayala A, Perrin MM, Kisala JM, Ertel W, Chaudry IH. Polymicrobial Sepsis Selectively Activates Peritoneal But Not Alveolar Macrophages to Release Inflammatory Mediators (Interleukin-1 and -6 and Tumor Necrosis Factor). Circ Shock. 1992;36:191-99.

108. Gurfinkel V, Pogetti RS, Fontes B, Novo FCF, Birolino D. Hypertonic Saline Improves Tissue Oxygenation and Reduces Systemic and Pulmonary Inflammatory Response Caused by Hemorrhagic Shock. *J Trauma*.2003;54:1137-2003.
109. Bagby GJ, Plessala KJ, Wilson LA, Thompson JJ, Nelson S. Divergent Efficacy of Antibody of Tumor Necrosis Factor α in Intravascular and Peritonitis Models of Sepsis. *JID*.1991;163:83-8.
110. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, Van der Meer WM, et al. Circulating Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor in Septic Shock and Experimental Endotoxin Fever. *JID*.1990;161:79-84.

ANEXOS

ANEXO 1 - Protocolo de Pesquisa

Data:		Animal No.:	
Grupo:		Peso:	
Hemograma			
Hemoglobina			
Hematócrito			
Leucócitos			
Neutrófilos			
Metamielócitos			
Bastonetes			
Segmentados			
Linfócitos			
Eosinófilos			
Outras alterações			
TNF α			
Lavado peritoneal			
Germe			
Concentração (UFC/ml)			
Histologia	Alteração (grau conforme codificação)		
Pulmão – Brônquio			
Pulmão – Interstício			
Pulmão – Alvéolo			
Fígado			
Rim			

ANEXO 2 – Certificado de Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa
Núcleo de Bioética

Curitiba, 13 de fevereiro de 2007.

PARECER N. 002.07/CEUA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética No Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em reunião realizada no dia 12 de fevereiro do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "Resposta do fluxo sanguíneo tecidual após reposição volêmica de sepse de origem abdominal", sob o registro no CEUA /PUCPR nº 195

O experimento classificado como de categoria C, será realizado com o número de 24 Ratos Wistar os quais após o experimento serão eutanasiados.

O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,



Prof.ª Dr.ª Antonia Maria Binder Prado

Presidente do Comitê de Ética No Uso de Animais da PUCPR

Ilmo Sr

Sergio Luiz Rocha