

**FABIO CARMONA**

**Papel da ativação do fator nuclear *kappa*-B na disfunção miocárdica  
do choque séptico pediátrico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de Doutor.  
Área de concentração: Saúde da Criança e do  
Adolescente.

Opção: Investigação em Pediatria.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula C. P. Carlotti.  
Volume único.

Ribeirão Preto

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabio Carmona: “Papel da ativação do fator nuclear *kappa*-B na disfunção miocárdica do choque séptico pediátrico.”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de Doutor.  
Área de concentração: Saúde da Criança e do  
Adolescente.

Opção: Investigação em Pediatria.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula C. P. Carlotti.  
Volume único.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho às crianças que participaram deste estudo e a seus pais, por assim o permitirem, admiravelmente, em momento de grande sofrimento.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a minha família, pelas oportunidades e pelo apoio incondicional.

Aos queridos amigos Dalma, Divane, Juliana, Viviane, Rodrigo e Orlando.

Ao colega e amigo Paulo Henrique Manso (PH), pelo seu companheirismo, pelo estímulo constante, pelo seu inesgotável bom-humor e, é claro, pelos ecocardiogramas realizados, em horas nem sempre oportunas. Agradeço também ao Dr. Gérson Antônio Tavares Jr. pela colaboração na realização dos ecocardiogramas, e aos colegas de trabalho da UTI Pediátrica do HC-FMRP-USP, pelo auxílio e convivência agradável que proporcionam a todos, e em especial à equipe de enfermagem, que tanto me ajudou na coleta das amostras.

Aos amigos dos laboratórios de Pediatria e Endocrinologia, em especial Fábio, Mara, Adriana, Vanessa, Letícia, Rosane e Fernando, pela paciência em ensinar-me a ter paciência. É a essência do trabalho bem feito. À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Palmira Cupo pela cessão do uso do Laboratório de Toxicologia da Unidade de Emergência, e à Dr<sup>a</sup> Maria José Leite da Silva e demais colegas desse laboratório pelo auxílio.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Margaret de Castro, pelas suas sugestões, conselhos e contribuições sempre muito valiosos, e pelo exemplo de dedicação à ciência.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Carlotti, por seu exemplo de dedicação à assistência dos doentes, por nunca desistir nas situações mais desesperadoras da prática clínica, e também pela orientação deste trabalho, com muita competência, paciência e, principalmente, pela sua confiança no meu trabalho.

## RESUMO

CARMONA, F. **Papel da ativação do fator nuclear kappa-B na disfunção miocárdica do choque séptico pediátrico.** 2009. 142 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Crianças com choque séptico apresentam elevada morbi-mortalidade. A disfunção miocárdica é uma complicação freqüente e caracteriza-se por redução da fração de ejeção (FE) e aumento do volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE). O papel da reação inflamatória sistêmica (SRIS) na gênese da disfunção miocárdica que ocorre nesses pacientes ainda não está completamente esclarecido. A SRIS é regulada pela atividade do fator nuclear *kappa*-B (NF- $\kappa$ B), que pode ser estimada pela quantificação da expressão relativa do gene de sua unidade inibidora, o I- $\kappa$ B $\alpha$ . A detecção precoce da disfunção miocárdica na população pediátrica é difícil na prática clínica. Nós estudamos uma coorte de 15 pacientes pediátricos internados na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) de um hospital terciário, com idade mediana de 62 meses (variando de 2 a 215 meses) com diagnóstico de choque séptico. Foram coletados dados clínicos e amostras de sangue diárias, e realizada ecocardiografia. As amostras de sangue foram analisadas para determinação da expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  por reação da polimerase em cadeia quantitativa em tempo real (RQ-PCR), e determinação das concentrações plasmáticas do peptídeo natriurético tipo B (BNP) e da troponina I cardíaca (cTnI). Os pacientes foram divididos em 2 grupos de acordo com a FE menor (grupo 1) e maior ou igual a 50% (grupo 2). Nossos resultados mostraram que pacientes do grupo 1 apresentavam menor ativação do NF- $\kappa$ B nos dias 1, 3 e

4, e menor FE nos dias 2 e 6. A ativação do NF- $\kappa$ B correlacionou-se positivamente com maior VDFVE. Dentre os pacientes com expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  acima da mediana no 1º dia observou-se maior proporção de indivíduos com FE  $\geq$  50%. As concentrações de cTnI e BNP correlacionaram-se positivamente entre si, mas não com parâmetros clínicos ou ecocardiográficos de disfunção miocárdica. Em conclusão, em pacientes pediátricos com choque séptico a maior ativação do NF- $\kappa$ B associou-se a melhores índices ecocardiográficos de disfunção miocárdica, o que poderia sugerir um papel daquele na ativação de mecanismos compensatórios cardíacos à injúria. BNP e cTnI não foram bons marcadores de disfunção miocárdica nessa população específica.

## ABSTRACT

CARMONA, F. **Role of nuclear factor kappa-B activation on myocardial dysfunction in pediatric septic shock.** 2009. 142 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Children with septic shock have high morbidity and mortality. Myocardial dysfunction is a common complication and is characterized by reduced ejection fraction (EF) and augmented left ventricle end-diastolic volume (LVEDV). The role of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) that occurs in these patients is not fully understood. SIRS is regulated by nuclear factor *kappa*-B (NF- $\kappa$ B) activity, which can be measured by its inhibitory unit (I- $\kappa$ B $\alpha$ ) relative gene expression. Early recognition of myocardial dysfunction in pediatric patients is difficult in clinical practice. We studied a cohort of 15 pediatric patients with septic shock admitted to the Pediatric Intensive Care Unit (PICU) of a tertiary-care hospital, with median age of 62 months (range: 2-215 months). Clinical and demographical data were recorded, blood samples were collected daily, and echocardiography was performed. Blood samples were analyzed for I- $\kappa$ B $\alpha$  relative gene expression by real time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR), and for determination of plasma levels of B-type natriuretic peptide (BNP) and cardiac troponin I (cTnI). Patients were divided into 2 groups, according to EF below (group 1) and above or equal to 50% (group 2). Our results showed that patients from group 1 had lower NF- $\kappa$ B activation on days 1, 3 and 4, and lower EF on days 2 and 6. NF- $\kappa$ B activation positively correlated with higher LVEDV. We observed a higher proportion of patients with values of EF  $\geq$  50% among those with I- $\kappa$ B $\alpha$



relative gene expression above the median on the 1<sup>st</sup> day. BNP and cTnI plasma levels correlated well with each other, but not with clinical or echocardiographic parameters of myocardial dysfunction. In conclusion, in pediatric patients with septic shock, higher NF- $\kappa$ B activation was associated to better echocardiographic parameters of myocardial dysfunction, which could suggest a beneficial role of the former on activation of cardiac compensatory mechanisms to injury. BNP and cTnI were not useful markers of myocardial dysfunction in this specific population.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fração de ejeção (%) durante o período de estudo. ....	46
Figura 2. Fração de encurtamento ( $\Delta d\%$ ) durante o período de estudo. ....	47
Figura 3. Volume diastólico final do ventrículo esquerdo ajustado pela superfície corporal ( $\text{ml}/\text{m}^2$ ) durante o período de estudo. ....	49
Figura 4. Índice sistólico ( $\text{ml}/\text{m}^2$ ) durante o período de estudo. ....	50
Figura 5. Índice cardíaco ( $\text{l}/\text{min}/\text{m}^2$ ) durante o período de estudo. ....	52
Figura 6. Concentração plasmática de troponina I cardíaca ( $\text{ng}/\text{ml}$ , em escala logarítmica) durante o período de estudo. ....	53
Figura 7. Concentração plasmática do peptídeo natriurético tipo B ( $\text{pg}/\text{ml}$ , em escala logarítmica) durante o período de estudo. ....	55
Figura 8. Expressão relativa do gene do I- $\kappa\text{B}\alpha$ (unidades arbitrárias, em escala logarítmica) durante o período de estudo. ....	56
Figura 9. Escore inotrópico calculado durante o período de estudo. ....	58
Figura 10. Volume de fluidos recebido ( $\text{ml}/\text{kg}/\text{dia}$ ) durante o período de estudo. ....	59
Figura 11. Pressão venosa central ( $\text{mmHg}$ ) durante o período de estudo. ....	61
Figura 12. Frequência cardíaca ( $\text{bpm}$ ) aferida durante o período de estudo. ....	62
Figura 13. Frequência cardíaca ajustada para idade durante o período de estudo. ....	64
Figura 14. Frequência respiratória ( $\text{irpm}$ ) durante o período de estudo. ....	65
Figura 15. Frequência respiratória ajustada para a idade durante o período de estudo. ....	67
Figura 16. Pressão arterial sistólica ( $\text{mmHg}$ ) durante o período de estudo. ....	68
Figura 17. Pressão arterial sistólica ajustada para idade e sexo durante o período de estudo. ..	70

Figura 18. Concentração do lactato arterial (mmol/l) durante o período de estudo.....	71
Figura 19. Débito urinário (ml/kg/h) durante o período de estudo. ....	73
Figura 20. Concentração sérica de creatinina (mg/dl) durante o período de estudo. ....	74
Figura 21. Proteína C reativa (mg/dl) durante o período de estudo. ....	76
Figura 22. Contagem de glóbulos brancos do sangue periférico (células/mm <sup>3</sup> ) durante o período de estudo.....	77
Figura 23. Contagem de plaquetas do sangue periférico (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) durante o período de estudo.....	79
Figura 24. Variação da temperatura axilar mínima e máxima de cada dia (°C) durante o período de estudo.....	80
Figura 25. Escore PELOD ( <i>Pediatric Logistic Organ Dysfunction</i> ) durante o período de estudo.....	82
Figura 26. Distribuição dos pacientes de acordo com a expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ e a fração de ejeção. ....	88
Figura 27. Evolução temporal da fração de ejeção (FE) e da expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ nos pacientes 01 a 08. ....	89
Figura 28. Evolução temporal da fração de ejeção (FE) e da expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ nos pacientes 09 a 15. ....	90
Figura 29. Expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ no dia anterior (-1), no dia do início do uso de corticóides (0) e no dia seguinte ao uso (+1).....	92
Figura 30. Expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ no 1º dia, em pacientes que receberam ou não corticóides no primeiro dia de internação. ....	93
Figura 31. Expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ somente nos pacientes que não receberam corticóides no primeiro dia de internação, nos grupos 1 e 2. ....	93

Figura 32. Primeira eletroforese para determinação da qualidade do RNA contido nas amostras.....	122
Figura 33. Segunda eletroforese para determinação da qualidade do RNA contido nas amostras.....	123
Figura 34. Terceira e quarta eletroforese para determinação da qualidade do RNA contido nas amostras.....	124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos, diagnósticos e comorbidades.....	42
Tabela 2 – Valores da mediana (e variação) da fração de ejeção (%) durante o período de estudo.....	45
Tabela 3 – Valores da mediana (e variação) da fração de encurtamento ( $\Delta d\%$ ) durante o período de estudo.....	47
Tabela 4 – Valores da mediana (e variação) do volume diastólico final do ventrículo esquerdo ajustado para a área de superfície corporal (VDFVEa, em ml/m <sup>2</sup> ) durante o período de estudo.....	48
Tabela 5 – Valores da mediana (e variação) do índice sistólico (ml/m <sup>2</sup> ) durante o período de estudo.....	50
Tabela 6 – Valores da mediana (e variação) do índice cardíaco (l/min/m <sup>2</sup> ) durante o período de estudo.....	51
Tabela 7 – Valores da mediana (e variação) da concentração plasmática de troponina I cardíaca (pg/ml) durante o período de estudo. ....	53
Tabela 8 – Valores da mediana (e variação) da concentração plasmática do peptídeo natriurético tipo B (pg/ml) durante o período de estudo. ....	54
Tabela 9 – Valores da mediana (e variação) da expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ (em unidades arbitrárias) durante o período de estudo.....	56
Tabela 10 – Valores da mediana (e variação) do escore inotrópico durante o período de estudo.....	57

Tabela 11 – Valores da mediana (e variação) do volume de fluidos recebido (ml/kg/dia) durante o período de estudo.....	59
Tabela 12 – Valores da mediana (e variação) da pressão venosa central (mmHg) durante o período de estudo.....	60
Tabela 13 – Valores da mediana (e variação) da frequência cardíaca (bpm) durante o período de estudo.....	62
Tabela 14 – Valores da mediana (e variação) da frequência cardíaca ajustada para idade durante o período de estudo.....	63
Tabela 15 – Valores da mediana (e variação) da frequência respiratória (irpm) durante o período de estudo.....	65
Tabela 16 – Valores da mediana (e variação) da frequência respiratória ajustada para idade durante o período de estudo.....	66
Tabela 17 – Valores da mediana (e variação) da pressão arterial sistólica (mmHg) durante o período de estudo.....	68
Tabela 18 – Valores da mediana (e variação) da pressão arterial sistólica ajustada para idade e sexo durante o período de estudo. ....	69
Tabela 19 – Valores da mediana (e variação) do lactato arterial (mmol/l) durante o período de estudo.....	71
Tabela 20 – Valores da mediana (e variação) do débito urinário (ml/kg/h) durante o período de estudo.....	72
Tabela 21 – Valores da mediana (e variação) da concentração sérica de creatinina (mg/dl) durante o período de estudo.....	74
Tabela 22 – Valores da mediana (e variação) da concentração sérica da proteína C reativa (mg/dl) durante o período de estudo.....	75

Tabela 23 – Valores da mediana (e variação) da contagem de glóbulos brancos do sangue periférico (células/mm <sup>3</sup> ) durante o período de estudo.....	77
Tabela 24 – Valores da mediana (e variação) da contagem de plaquetas do sangue periférico (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) durante o período de estudo.....	78
Tabela 25 – Valores da mediana (e variação) da temperatura axilar mínima e máxima (°C) durante o período de estudo.....	80
Tabela 26 – Valores da mediana (e variação) do escore PELOD ( <i>Pediatric Logistic Organ Dysfunction</i> ) durante o período de estudo.....	81
Tabela 27 – Índices de correlação (r) e significância (p) entre as variáveis clínicas, laboratoriais e ecocardiográficas no 1º dia de evolução.....	84
Tabela 28 – Distribuição dos pacientes de acordo com a fração de ejeção (acima ou abaixo de 50%) e a expressão relativa do gene do I-κBα (abaixo ou acima da mediana).....	87

## ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura	Significado
ANP	Peptídeo natriurético tipo A
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
bpm	Batimentos por minuto
CARS	<i>Compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CNP	Peptídeo natriurético tipo C
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
cTnI	Troponina cardíaca I
DC	Débito cardíaco
DDVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSVE	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
DVP	Derivação ventrículo-peritoneal
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
FiO <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
FR	Frequência respiratória
GH	Hormônio do crescimento
GMPc	Guanidina monofosfato cíclico
HC-FMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IC	Índice cardíaco
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
INR	<i>International normalised ratio</i>
irpm	Incursões respiratórias por minuto
IS	Índice sistólico
I-κBα	Inibidor alfa do fator nuclear kappa-B
kPa	Kilo-Pascal
LPS	Lipopolissacáride
MARS	<i>Mixed antagonists response syndrome</i>
MIE	Membro inferior esquerdo
mmHg	Milímetros de mercúrio
MSE	Membro superior esquerdo

(continua)



(continuação)	
n/a	Não se aplica
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
NO	Óxido nítrico
PaCO <sub>2</sub>	Pressão parcial arterial de gás carbônico
PALS	<i>Pediatric Advanced Life Support</i>
PaO <sub>2</sub>	Pressão parcial arterial de oxigênio
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Proteína C reativa
PELOD	<i>Paediatric Logistic Organ Dysfunction</i>
PO	Pós-operatório
PRISM	<i>Pediatric Risk of Mortality</i>
PVC	Pressão venosa central
RDNPM	Retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor
RNA(m)	Ácido ribonucléico (mensageiro)
rpm	Rotações por minuto
RQ-PCR	Reação da polimerase em cadeia quantitativa em tempo real
RVS	Resistência vascular sistêmica
SaO <sub>2</sub>	Saturação arterial de oxigênio
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SF	Soro fisiológico (NaCl) a 0,9%
SNC	Sistema nervoso central
SRIS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SvO <sub>2</sub>	Saturação venosa central ou mista de oxigênio
Tax	Temperatura axilar
TBE	Solução de Tris, Borato e EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativado
UTIP	Unidade de terapia intensiva pediátrica
VDFVEa	Volume diastólico final do ventrículo esquerdo ajustado para a área de superfície corporal
VE	Ventrículo esquerdo
Δd%	Fração de encurtamento, ou delta-D

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
2. Objetivos .....	29
3. Casuística e métodos .....	30
4. Resultados .....	41
5. Discussão.....	94
6. Conclusões.....	108
7. Referências .....	109
8. Apêndices .....	117
9. Anexos.....	133

## 1. Introdução

Choque séptico é a maior causa de mortalidade e morbidade em crianças e adultos em todo o mundo (PATHAN et al., 2004) e a causa mais comum de morte em unidades de terapia intensiva (MEHTA et al., 2004; PARRILLO, 1993; SPIES et al., 1998). Estima-se que 400.000 casos de sepse e 200.000 episódios de choque séptico ocorram anualmente nos Estados Unidos, resultando em mais de 100.000 mortes (DAS, 2003; PARRILLO, 1993; PRICE et al., 1999; SPIES et al., 1998; ZHANG; GHOSH, 2000). Uma das manifestações mais importantes do choque séptico é a disfunção miocárdica (CASTILLO et al., 2004; FERNANDES et al., 1999; MEHTA et al., 2004; PATHAN et al., 2004; THIRU et al., 2000; TURNER et al., 1999; VER ELST et al., 2000), que pode estar presente em cerca de 40-44% dos adultos (CHARPENTIER et al., 2004; PRICE et al., 1999) e 80% das crianças (CENEVIVA et al., 1998) e associa-se a maior mortalidade (FERNANDES et al., 1999). Caracteriza-se por depressão sistólica, com redução da fração de ejeção (FE) e dilatação diastólica do ventrículo esquerdo (VE), com aumento do volume diastólico final (VDFVE) (FERNANDES et al., 1999; MEHTA et al., 2004; PARKER et al., 1984; THIRU et al., 2000; TURNER et al., 1999; VER ELST et al., 2000). Paradoxalmente, a dilatação do VE e a redução da FE estão associadas à maior sobrevida, refletindo compensação ventricular pelo mecanismo de Frank-Starling. A ausência de dilatação ventricular associa-se à mortalidade mais elevada em adultos (PARKER et al., 1984; PARRILLO, 1993).

Em geral, pacientes adultos com choque séptico apresentam índice cardíaco (IC) normal ou elevado, apesar da redução na FE do VE, à custa de acentuada redução na

resistência vascular sistêmica (RVS) e taquicardia (CASTILLO et al., 2004; PARKER et al., 1984; PARRILLO, 1993; SCHWARTZ et al., 2001; WITTHAUT et al., 2003). Na população pediátrica, os pacientes com choque séptico refratário a fluidos estão frequentemente hipodinâmicos e respondem à terapia com inotrópicos e vasodilatadores. Em estudo com 50 crianças com choque séptico, Ceneviva et al demonstraram que após a ressuscitação hídrica, 58% das crianças apresentaram baixo IC e responderam à terapia inotrópica, com ou sem o uso de vasodilatador, 20% apresentaram IC elevado e RVS baixa e responderam à terapia vasopressora isolada, e 22% apresentaram disfunção cardíaca e vascular e responderam à terapia combinada com inotrópico e vasopressor (CENEVIVA et al., 1998). Devido à heterogeneidade dos estados hemodinâmicos e de sua mudança com o tempo, um regime terapêutico cardiovascular incorreto deve ser suspeitado em qualquer criança com choque persistente.

As principais hipóteses que têm sido sugeridas para explicar a disfunção miocárdica observada em pacientes com choque séptico são: (a) hipoperfusão miocárdica; (b) fatores depressores circulantes; (c) aumento da produção local de NO; (d) alterações no metabolismo celular; (e) perda de integridade celular (apoptose); (f) disfunção autonômica; (g) disfunção mitocondrial; e (h) desacoplamento dos receptores beta-adrenérgicos (COURT et al., 2002; GROCOTT-MASON; SHAH, 1998; KUMAR et al., 1996; PARRILLO, 1993; PRICE et al., 1999; RUDIGER; SINGER, 2007). Esses fatores atuam por dois mecanismos principais: lesão celular miocárdica direta e depressão contrátil funcional. A lesão celular culminando em morte celular leva à disfunção permanente, enquanto que a depressão contrátil funcional pode ser reversível com a evolução do quadro. Dados de estudos histopatológicos de tecido cardíaco de pacientes sépticos revelaram infiltrado inflamatório agudo clássico, caracterizado pela presença de células polimorfonucleares e vários pontos de necrose tecidual (FERNANDES et al., 1999). A morte celular miocárdica pode desempenhar um papel na

disfunção cardíaca do choque séptico meningocócico em crianças (THIRU et al., 2000) e na sepse em adultos (MEHTA et al., 2004). Caracteristicamente, pacientes com choque séptico apresentam disfunção da microcirculação, com distúrbios do fluxo sanguíneo regional e comprometimento da oxigenação tecidual. Essa alteração pode levar à isquemia relativa de vários órgãos, inclusive do coração (THIRU et al., 2000; VER ELST et al., 2000). Além disso, procedimentos de ressuscitação ou medicamentos vasopressores podem estar envolvidos no processo (TURNER et al., 1999; VER ELST et al., 2000). Outras causas potenciais são: lesão isquêmica devido ao consumo elevado de O<sub>2</sub>, redução na pressão de perfusão e oferta reduzida de O<sub>2</sub> ao miocárdio (AMMANN et al., 2001). Entretanto, recentemente, diversos estudos demonstraram que pacientes com choque séptico têm fluxo sanguíneo coronariano normal ou elevado, contrariando a hipótese de lesão miocárdica isquêmica (COURT et al., 2002; GROCOTT-MASON; SHAH, 1998; PARRILLO, 1993; PRICE et al., 1999). Apoptose pode ser induzida pelas altas concentrações de TNF- $\alpha$  ou NO, levando à disfunção contrátil não-reversível e ao aumento da concentração de troponina I cardíaca (cTnI), não-relacionados a alterações na perfusão coronariana (COURT et al., 2002; GROCOTT-MASON; SHAH, 1998; PARRILLO, 1993; RUDIGER; SINGER, 2007).

A existência de um fator circulante depressor do miocárdio tem sido aventada desde longa data. As principais substâncias relacionadas à depressão miocárdica funcional são as citocinas pró-inflamatórias: interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-2, IL-6, e interferon- $\gamma$ ; e o óxido nítrico (NO) (FERNANDES et al., 1999; RUDIGER; SINGER, 2007). A idéia mais aceita atualmente é a de que todas essas substâncias atuam ao mesmo tempo, podendo ter atividades sinérgicas (COURT et al., 2002; GROCOTT-MASON; SHAH, 1998; KUMAR et al., 1996). Hipovolemia, acidose e distúrbios eletrolíticos também podem deprimir a contratilidade miocárdica, mas este fenômeno geralmente persiste mesmo após a correção desses distúrbios. Outros fatores podem contribuir para a lesão miocárdica durante o

choque séptico, dentre eles, um possível efeito miocitotóxico direto de endotoxinas bacterianas (lipopolissacáride ou LPS) ou mediadores inflamatórios locais ou circulantes, induzidos pelo processo infeccioso e produzidos por leucócitos ativados, macrófagos e células endoteliais (AMMANN et al., 2001; TURNER et al., 1999; VER ELST et al., 2000). Além disso, alterações no metabolismo das células miocárdicas têm sido demonstradas por diversos autores (PARRILLO, 1993; RUDIGER; SINGER, 2007; SCHWARTZ et al., 2001). As principais alterações observadas são: (a) alterações da homeostase do cálcio e de (b) sua interação com as proteínas contráteis; (c) mudanças na utilização de substratos energéticos pelo miocárdio (NEUBAUER, 2007; RUDIGER; SINGER, 2007). Apesar das inúmeras tentativas de intervenções farmacológicas na sepse e no choque séptico, na tentativa de bloquear o processo inflamatório, não houve melhora na sobrevivência até o momento (BONE et al., 1997). Os estudos têm se focado na fase pró-inflamatória da sepse, sem que haja evidências de que esta seja a fase dominante no momento da intervenção. Alguns autores sugerem que a evolução desses pacientes depende do equilíbrio entre citocinas pró e antiinflamatórias (BONE et al., 1997; DAS, 2003; PRICE et al., 1999). Sabe-se que, em resposta à fase pró-inflamatória inicial, segue-se uma reação antiinflamatória compensatória, que alguns autores têm chamado de CARS (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*). Admite-se também que possa haver um estado intermediário de desorganização da resposta inflamatória, denominado MARS (*mixed antagonists response syndrome*) (BONE et al., 1997). Após o reconhecimento de um insulto inicial, o organismo produz moléculas pró-inflamatórias que ativam as defesas celulares, e posteriormente, moléculas antiinflamatórias, para atenuar e conter a resposta pró-inflamatória (BONE et al., 1997). Estes mediadores interagem entre si, num sistema complexo que influencia diretamente os mecanismos endoteliais, cardiovasculares, hemodinâmicos e de coagulação. Se o equilíbrio não puder ser atingido e a homeostase não for restabelecida, haverá predomínio da reação pró-inflamatória

(SRIS) ou antiinflamatória compensatória (CARS) (BONE et al., 1997). Atualmente, a idéia de que os mediadores pró-inflamatórios são prejudiciais vem sendo abandonada, pois a liberação de citocinas é parte normal e saudável da resposta imune a insultos ou infecções. Quantidades excessivas podem ser prejudiciais, mas quantidades adequadas são necessárias para combater organismos patogênicos e promover a cura (BONE et al., 1997).

A endotoxina bacteriana, ou LPS, presente na membrana celular de bactérias gram-negativas, está envolvida na fisiopatologia do choque séptico (PARRILLO, 1993), pois induz a ativação de fatores de transcrição e a liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (ZHANG; GHOSH, 2000). Estudos recentes sugerem que o LPS é reconhecido pela glicoproteína de membrana CD14 e por receptores *Toll-like*, disparando a cascata que leva à ativação do fator nuclear *kappa*-B (NF- $\kappa$ B) e à produção de mediadores inflamatórios. O NF- $\kappa$ B é o principal fator de transcrição que regula a expressão de genes que codificam moléculas e mediadores pró-inflamatórios, como moléculas de adesão, proteínas de fase aguda, óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), ciclo-oxigenase 2 (COX-2), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6. Em células não estimuladas, o NF- $\kappa$ B é retido no citoplasma, sob a forma de complexos com proteínas inibitórias (I- $\kappa$ B). Quando a célula é exposta a estímulos, como endotoxina, vírus, TNF- $\alpha$  e IL-1, proteínas-quinase são ativadas e ocorre a fosforilação e degradação do I- $\kappa$ B, liberando o NF- $\kappa$ B, que se move para o núcleo, onde se liga a seqüências específicas de genes-alvo. Este processo é terminado pela ativação induzida pelo NF- $\kappa$ B da transcrição de genes que codificam o I- $\kappa$ B, que entra no núcleo e se liga ao NF- $\kappa$ B, causando a dissociação de sua ligação no DNA e seu retorno ao citoplasma como complexo inativo. Desta forma, o NF- $\kappa$ B termina sua própria atividade (SENFTLEBEN; KARIN, 2002).

Tem sido sugerido que a ativação exagerada de NF- $\kappa$ B leva à ativação descontrolada de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios, contribuindo para a patogênese da síndrome da resposta inflamatória sistêmica e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas.

Pacientes com choque séptico apresentam atividade de ligação de NF- $\kappa$ B aumentada em células mononucleares do sangue periférico (DAS, 2003; ZHANG; GHOSH, 2000). Há evidências de maior ativação do NF- $\kappa$ B em pacientes gravemente doentes que morrem comparados com aqueles que sobrevivem (BOHRER et al., 1997; PATERSON et al., 2000). Kumar et al (1996) demonstraram que a disfunção miocárdica induzida pelo LPS é mediada pelo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (KUMAR et al., 1996). Ratos com super-expressão de I- $\kappa$ B e, portanto, com inibição aumentada do NF- $\kappa$ B, não apresentam aumento da produção de TNF- $\alpha$  e não desenvolvem disfunção miocárdica após injeção de LPS (HAUDEK et al., 2001). A inibição da ativação do NF- $\kappa$ B em modelos de sepse em camundongos melhorou a sobrevivência (BOHRER et al., 1997).

Por outro lado, existem relatos de aumento na mortalidade após uso de bloqueadores do TNF- $\alpha$  em pacientes com sepse grave (HOTCHKISS; KARL, 2003). Em outros estudos, a administração de etil-piruvato, um inibidor inespecífico da ativação do NF- $\kappa$ B, em modelo de sepse em camundongos, resultou em maior mortalidade em alguns trabalhos, mas não em outros dos mesmos autores (SU et al., 2008). Em outro estudo, também em camundongos transgênicos incapazes de ativar a via do NF- $\kappa$ B, a administração de LPS resultou em maior apoptose celular endotelial, maior permeabilidade capilar e maior mortalidade (GADJEVA et al., 2004).

A resposta do organismo ao estresse envolve a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a produção de glicocorticóides, que atuam como imunomoduladores, aumentando a síntese de proteínas antiinflamatórias e diminuindo a síntese de proteínas pró-inflamatórias, pela inibição do NF- $\kappa$ B. Por interação direta proteína-proteína, os glicocorticóides impedem a ligação do NF- $\kappa$ B aos genes-alvo. Além disso, induzem a síntese de I- $\kappa$ B, que resulta na retenção de NF- $\kappa$ B no citoplasma. Alguns estudos experimentais e relato de caso em humano sugerem que o uso de glicocorticóides e inibidores específicos do NF- $\kappa$ B resultam em



melhora das condições hemodinâmicas e diminuição da inflamação, associadas à redução da ativação excessiva do NF- $\kappa$ B no choque séptico (FRODE-SALEH; CALIXTO, 2000; VAN LEEUWEN et al., 2001).

A ativação do NF- $\kappa$ B tem sido avaliada pela quantificação da expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  por reação da polimerase em cadeia em tempo real (RQ-PCR). A quantidade de RNAm reflete a taxa de transcrição do gene correspondente e o balanço entre a estabilização e a degradação do RNAm. Há evidências de que o aumento da quantidade de RNAm de I- $\kappa$ B $\alpha$  correlaciona-se com a ativação do NF- $\kappa$ B e que após a remoção do estímulo, os níveis de RNAm de I- $\kappa$ B $\alpha$  retornam à linha de base após 6 horas (BOTTERO et al., 2003).

A detecção precoce de injúria miocárdica constitui um desafio, sobretudo na faixa etária pediátrica (KAPLAN, 1997), pois na criança, os sinais de falência miocárdica são inespecíficos e, quando manifestos, a condição frequentemente já está instalada e em estágio avançado. Clinicamente, estados de baixo débito cardíaco se manifestam por alterações do estado mental (irritabilidade ou letargia), diminuição da perfusão periférica, com extremidades frias, tempo de enchimento capilar prolongado (> 2 segundos) e pulsos periféricos de amplitude diminuída, e diminuição do débito urinário. Parâmetros laboratoriais úteis incluem o aumento do lactato arterial e a acidose metabólica, por hipóxia tecidual e metabolismo anaeróbico; a diminuição da saturação venosa mista ou central (<65-70%) e o aumento da extração de oxigênio, com diferença arteriovenosa de O<sub>2</sub> >25-30%, devido a baixo fluxo sanguíneo tecidual; e o aumento das concentrações plasmáticas de uréia, creatinina e potássio, por diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular. Tem sido demonstrado que a ecocardiografia pode ser utilizada para estimar o débito cardíaco de maneira precisa, constituindo dispositivo útil para monitorização hemodinâmica (BROWN, 2002). A monitorização invasiva do débito cardíaco pelo uso de

cateteres de artéria pulmonar (Swan-Ganz) pode, em adultos, facilitar o manejo terapêutico. Porém, na população pediátrica, dificuldades técnicas colocam seu uso em segundo plano.

As dificuldades do diagnóstico precoce da disfunção miocárdica levaram à busca de alternativas ao julgamento clínico. Recentemente, as troponinas cardíacas e os peptídeos natriuréticos têm sido utilizados como marcadores de disfunção miocárdica e indicadores de mortalidade e prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC), infarto agudo do miocárdio, sepse, choque séptico e no pós-operatório de cirurgias cardíacas (CARMONA et al., 2008; CASTILLO et al., 2004; HORWICH et al., 2003; MEHTA et al., 2004). Alguns autores recomendam o uso da abordagem “multimarcador”, utilizando as troponinas cardíacas e os peptídeos natriuréticos em conjunto (MCCULLOUGH; FONAROW, 2003).

As troponinas cardíacas são peptídeos componentes do mecanismo contrátil das células musculares cardíacas. Existem três tipos: T, I e C, que participam da contração muscular pela interação entre a actina e a miosina, tornando o processo cálcio-dependente. O aumento da concentração sérica de troponinas cardíacas indica lesão miocárdica ou perda da integridade da membrana celular. Há evidências de aumento das concentrações plasmáticas de cTnI em pacientes com sepse e choque séptico, possivelmente relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana celular miocárdica induzido por mediadores inflamatórios, que alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática, permitindo o extravasamento de cTnI para o espaço extracelular. Fatores adicionais, como hipotensão, choque ou uso de agentes inotrópicos e vasopressores também podem contribuir para o aumento da cTnI em pacientes com sepse e choque séptico (AMMANN et al., 2001; THIRU et al., 2000). Em estudos com pacientes adultos com choque séptico, observou-se alta prevalência de aumento da cTnI no momento da admissão e nos dois dias subseqüentes, verificando-se forte associação entre os níveis de cTnI, disfunção do VE e mortalidade (FERNANDES et al., 1999; MEHTA et al.,

2004; TURNER et al., 1999; VER ELST et al., 2000). Em crianças com meningococemia e choque séptico, demonstrou-se elevação da cTnI em 24% dos pacientes na admissão e em 62%, em até 48 horas, com pico entre 12 e 36 horas após a admissão. Houve correlação inversa significativa entre o pico de cTnI e a mínima FE e associação entre o pico de cTnI, o grau de suporte inotrópico requerido e a mortalidade predita pelo escore PRISM (THIRU et al., 2000).

Os peptídeos natriuréticos estão envolvidos na regulação da pressão arterial e da volemia (WITTHAUT et al., 2003). São produzidos no coração e liberados na circulação em resposta ao aumento da tensão transmural, refletindo hipervolemia ou sobrecarga pressórica (BAYES-GENIS et al., 2004; COWIE; MENDEZ, 2002; MCCULLOUGH et al., 2004; WITTHAUT et al., 2003). Atuam induzindo vasodilatação arterial e venosa, aumento da natriurese e diurese, inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona e da atividade nervosa simpática e relaxamento da musculatura lisa (AZZAZY; CHRISTENSON, 2003; COWIE; MENDEZ, 2002; FONAROW; HORWICH, 2003; MCCULLOUGH et al., 2004). Não possuem efeito cronotrópico ou inotrópico (MCCULLOUGH et al., 2004). Existem três tipos conhecidos de peptídeos natriuréticos: A (ANP), B (BNP) e C (CNP), que atuam através de receptores específicos, aumentando a produção de guanidina monofosfato cíclico (GMPc). O ANP é predominantemente liberado nos átrios em resposta à sobrecarga de volume, o BNP é sintetizado pelos ventrículos cardíacos em resposta ao estiramento da parede ventricular e o CNP é sintetizado e liberado pelo endotélio vascular (AZZAZY; CHRISTENSON, 2003). O BNP é produzido a partir de um precursor, prepro-BNP, que é clivado a pro-BNP e liberado no sangue, onde é finalmente processado na forma ativa de 32 aminoácidos (BNP) e no metabólito inativo N-terminal pro-BNP (AZZAZY; CHRISTENSON, 2003; COWIE; MENDEZ, 2002; FONAROW; HORWICH, 2003; MCCULLOUGH et al., 2004).

Está bem estabelecido que os níveis circulantes de BNP estão aumentados em pacientes com insuficiência cardíaca e se correlacionam com a gravidade da doença (FONAROW; HORWICH, 2003). A meia-vida do BNP é de 22 minutos, o que o torna um bom marcador de mudanças agudas nas condições hemodinâmicas do paciente (MCCULLOUGH et al., 2004). Em pacientes com sepse e choque séptico, demonstrou-se correlação inversa significativa entre os níveis de BNP e o índice cardíaco (WITTHAUT et al., 2003). Citocinas pró-inflamatórias, aumentadas na ICC e na sepse, podem contribuir para a secreção dos peptídeos natriuréticos. Estudos *in vitro* mostraram aumento na expressão gênica de BNP e prepro-ANP em culturas de cardiomiócitos estimulados com IL-1 $\beta$  e aumento na secreção dos peptídeos natriuréticos após estimulação com IL-6 (WITTHAUT et al., 2003). Além disso, há evidências de que a noradrenalina e a endotelina-1, ambas potentes cardiotoxinas, possam diretamente estimular a secreção de BNP pelo miocárdio (KOULOURI et al., 2004).

### **1.1. Hipóteses**

Nossas hipóteses são:

1. O BNP e a cTnI constituem ferramentas úteis para o diagnóstico precoce de disfunção miocárdica em crianças com choque séptico.
2. A ativação do NF- $\kappa$ B é diretamente proporcional à gravidade da disfunção miocárdica em crianças com choque séptico.

## 1.2. Relevância do Estudo

O diagnóstico precoce da disfunção miocárdica em pacientes com sepse e choque séptico pode contribuir para a terapêutica direcionada ao estado hemodinâmico particular de cada paciente, influenciando a evolução e a morbi-mortalidade. Pacientes com choque séptico podem se beneficiar de marcadores mais precisos e objetivos para a detecção precoce da disfunção miocárdica. Esses marcadores poderiam ser utilizados para adequar e prever o momento ideal do início ou da retirada do suporte cardiovascular. Além disso, o papel da ativação do NF- $\kappa$ B na disfunção miocárdica em pacientes com sepse e choque séptico não está totalmente esclarecido e não há estudos sobre o assunto em crianças. A maior compreensão desses mecanismos motivará novos estudos direcionados ao desenvolvimento de terapias visando à modulação da atividade do NF- $\kappa$ B e melhora das condições hemodinâmicas e do prognóstico destes pacientes.

## 2. Objetivos

- Avaliar a ativação do NF- $\kappa$ B, medida pela expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ , em leucócitos do sangue periférico, e determinar as concentrações plasmáticas da cTnI e do BNP, diariamente, até a suspensão das drogas vasoativas, ou até o 14º dia de evolução, o que vier primeiro.
- Verificar a associação dos marcadores cTnI e BNP e da intensidade da ativação do NF- $\kappa$ B com o grau e duração da disfunção miocárdica, tempo de internação na unidade de terapia intensiva pediátrica (UTIP) e hospitalar, tempo de ventilação mecânica, duração da disfunção orgânica, e mortalidade (na UTIP e após 28 dias de evolução).

### 3. Casuística e métodos

#### 3.1. Desenho do estudo

Trata-se de estudo observacional, de caráter transversal e longitudinal, prospectivo, do tipo coorte.

#### 3.2. Amostragem

Foram elegíveis para o estudo os pacientes internados na unidade de terapia intensiva pediátrica (UTIP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), consecutivamente, durante o período de estudo.

#### 3.3. Critérios de inclusão

Pacientes com o diagnóstico de choque séptico de acordo com as definições do *International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics* (GOLDSTEIN et al., 2005):

- **Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS):** A presença de pelo menos 2 dos seguintes critérios, um dos quais tem que ser temperatura ou contagem de leucócitos anormal:

1. **Temperatura** central acima de 38,5 °C ou abaixo de 36 °C;

2. **Taquicardia**, definida com frequência cardíaca média acima de 2 desvios-padrão do valor normal para a idade, na ausência de estímulos externos, uso crônico de drogas, ou estímulos dolorosos; ou ainda uma elevação inexplicável persistente num período de 30 minutos a 4 horas **OU** para crianças abaixo de 1 ano: **bradicardia**, definida como frequência cardíaca média abaixo do 10º percentil para a idade, na ausência de estímulo vagal externo, uso de drogas  $\beta$ -bloqueadoras, ou cardiopatia congênita; ou ainda uma queda inexplicável persistente num período de 30 minutos.
  3. **Frequência respiratória** média acima de 2 desvios-padrão do valor normal para a idade ou uso de ventilação mecânica para um processo agudo não relacionado a doença neuromuscular de base ou anestesia geral;
  4. Contagem de **leucócitos** elevada ou reduzida para a idade (não secundária à leucopenia induzida por quimioterapia) ou mais do que 10% de neutrófilos imaturos.
- **Infecção:** Uma infecção suspeita ou confirmada (por culturas positivas, exame microscópico de tecidos, ou teste da reação da polimerase em cadeia (PCR)) causada por qualquer patógeno **OU** uma síndrome clínica associada com uma alta probabilidade de infecção. Evidências de infecção incluem achados positivos de exame físico, exames de imagem, ou testes laboratoriais (ex: presença de leucócitos em um fluido corporal normalmente estéril, perfuração de vísceras, radiografia de tórax compatível com pneumonia, púrpura ou petéquias, ou púrpura fulminante);
  - **Sepse:** SRIS na presença de ou resultante de infecção suspeita ou confirmada.
  - **Sepse Grave:** Sepses associada a uma das seguintes condições: disfunção cardiovascular **OU** síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) **OU** disfunção de dois ou mais



outros órgãos. Disfunções de órgãos foram definidas de acordo com o PELOD (ver anexo 9.13) (LETEURTRE et al., 2003).

- **Choque Séptico:** Sepsis com disfunção orgânica cardiovascular.

### **3.4. Critérios de exclusão**

- Cardiopatia ou cirurgia cardíaca prévia;
- Uso prévio de drogas cardiopáticas (ex: quimioterápicos antracíclicos);
- Doença coronariana ou infarto anterior;
- Pacientes portadores do HIV (sintomáticos ou assintomáticos);
- Uso de cardioversão elétrica ou desfibrilação na última semana;
- Recém-nascidos;
- Solicitação dos pais ou responsáveis.

### **3.5. Aspectos éticos**

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP e aprovado em 12/09/2005 (processo HCRP nº 6060/2005 – ver anexo 9.1). Foi obtida autorização dos pais ou responsáveis pelos pacientes através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme modelo em anexo, de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde de número 196/96. Os pacientes participantes do estudo terão sua identidade preservada. Não foram previstas indenizações de qualquer espécie para os participantes do estudo. Os autores não consideraram necessário definir critérios para interrupção do estudo por tratar-se de estudo observacional.

### 3.6. Tratamento dos participantes

Todos os pacientes incluídos no estudo tiveram tratamento disponibilizado na UTIP de acordo com protocolo pré-definido para choque séptico (CARLOTTI, 2005). O protocolo de tratamento está descrito a seguir.

#### *Manutenção das vias aéreas, ventilação e oxigenação:*

Posicionamento adequado da cabeça e administração de O<sub>2</sub> a 100% por meio de máscara não-reinalante. A intubação traqueal deve ser realizada nas seguintes situações: (a) aumento do trabalho respiratório, (b) hipoventilação central ou periférica, (c) diminuição do nível de consciência, ou (d) instabilidade hemodinâmica grave. **Acesso vascular:** De acordo com as recomendações do PALS (*Pediatric Advanced Life Support*) (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2002): acesso venoso periférico, central ou intra-ósseo.

#### *Adequação da volemia:*

- **Expansão volêmica** com soro fisiológico 0,9% (SF) 20 ml/kg EV, em 5-20 minutos, podendo ser repetida pelo menos mais duas vezes na primeira hora (volume total: 60 ml/kg em 1 hora).
- Se PVC baixa, após administração de 60 ml/kg de SF, fazer expansão com albumina a 5%, 10-20 ml/kg em 5-20 minutos.
- Prosseguir expansões até adequação da volemia (**manter PVC entre 8-12 mmHg**).
- Se PVC entre 8-12 mmHg, pequenas alíquotas de volume (2-5 ml/kg) podem ser feitas, seguidas de reavaliação dos valores de PVC (aumento da PVC  $\geq$  2 mmHg indica adequação da volemia).

- Se volemia adequada e paciente ainda estiver em choque, iniciar drogas vasoativas.

***Drogas vasoativas:***

- Iniciar dopamina 10-15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ .
- Se não houver melhora:
  - ✓ Choque frio: Epinefrina 0,1-0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ .
  - ✓ Choque quente: Norepinefrina 0,1-0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ .
- Caso o paciente mantenha-se em choque, solicitar ecocardiograma para avaliar o débito cardíaco (DC):
  - ✓ DC elevado e RVS diminuída (choque quente com PA baixa): Aumentar norepinefrina (até 2-3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ).
  - ✓ DC diminuído e RVS diminuída (choque frio com PA baixa): Titular epinefrina até 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . Considerar a associação de norepinefrina 0,01-0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (doses mais elevadas podem ser necessárias).
  - ✓ DC diminuído e RVS aumentada (choque frio com PA levemente diminuída, normal ou até alta): Dobutamina 5-15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  ou milrinona (0,375-0,75  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) ou nitroprussiato de sódio (0,5-8  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ).

***Antibioticoterapia***

Instituída conforme rotina específica.

***Drenagem de coleções purulentas***

Devem ser prontamente indicadas, seja à beira do leito ou no centro cirúrgico (ex: abscessos, empiema, etc.).

### ***Maximização do transporte de oxigênio***

Transfusão de concentrado de hemácias se hemoglobina  $\leq 10$  g/dl.

### ***Sedação e analgesia***

Indicada para pacientes intubados e ventilados mecanicamente, ou para realização de procedimentos dolorosos (punções venosas, coleta de exames, fisioterapia, etc.).

### ***Manutenção da temperatura***

Controle da temperatura corpórea por meio de aquecimento ou resfriamento do ambiente, uso de manta térmica, uso de antitérmicos e compressas.

### ***Equilíbrio hidroeletrolítico, metabólico e ácido-base***

Correção imediata dos distúrbios, com atenção especial à manutenção da glicemia, concentrações séricas de cálcio e de bicarbonato.

### ***Corticóides***

Indicações: (a) púrpura fulminante, (b) uso crônico de corticosteróides, e (c) em casos de choque refratário (insuficiência adrenal suspeita ou confirmada). Administrar hidrocortisona em doses de estresse: Ataque 50 mg (lactentes), 100 mg (crianças maiores e adolescentes). Manutenção 100 mg/m<sup>2</sup>/dia, dividido de 6/6 horas.

## **3.7. Coleta e processamento inicial das amostras**

Foram coletadas amostras de sangue (3 ml) na admissão e diariamente, pela manhã, através de cateter arterial, cateter venoso central ou por punção arterial, em tubo contendo EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético) (BD Vacutainer Systems, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK). A seguir, as amostras foram processadas para separação do plasma e

conservação do RNA, DNA e proteínas em Trizol LS® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) (ver anexo 9.2), sendo armazenadas a -70 °C em duas alíquotas separadas.

### **3.8. Análise das amostras**

As análises foram realizadas pelo pesquisador, nos Laboratórios de Pediatria, Endocrinologia e de Toxicologia do HC-FMRP-USP. As concentrações de BNP foram determinadas no plasma, pelo método imunoenzimático (ELISA) semi-automatizado Triage® BNP (Biosite Incorporated, San Diego, CA, USA). As concentrações plasmáticas de cTnI foram determinadas por ensaio imunoenzimático tipo sanduíche com detecção final por fluorescência (ELFA), em aparelho semi-automatizado miniVIDAS® (bioMérieux Vitek Inc., Marcy l'Etoile, France).

A ativação do NF- $\kappa$ B nos leucócitos do sangue periférico foi avaliada pela quantificação da expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ , por RQ-PCR (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) (BOTTERO et al., 2003). Utilizou-se a sonda Taqman® para I- $\kappa$ B $\alpha$  humano [referência: Hs\_00153283\_m1, *Reporter*: FAM] (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) e controle endógeno GUS- $\beta$  [*Reporter*: VIC, *Quencher*: TAMRA] (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) (ver protocolo de RQ-PCR no anexo 9.10). Procedeu-se à extração do RNA (ver anexo 9.5) em uma das alíquotas armazenadas. Todas as amostras tiveram a qualidade do RNA avaliada por eletroforese em gel de agarose (ver protocolo no anexo 9.6 e resultados no apêndice 8.1) e quantificação do RNA por espectrofotometria (Eppendorf® BioPhotometer Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) (ver anexo 9.9 e apêndice 8.4). Nos casos em que foi constatada degradação importante do RNA, sem visualização das duas bandas de RNA na eletroforese em gel de agarose, foi realizada a extração do RNA na alíquota sobressalente. Nos casos em que foi

evidenciada contaminação por DNA, a amostra foi tratada com DNase. A seguir, procedeu-se à síntese de DNA complementar (cDNA, ver anexo 9.10) para a realização da RQ-PCR. Todas as análises foram feitas em duplicata. O cálculo da expressão gênica do I- $\kappa$ B $\alpha$  foi feito pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  descrito previamente (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O calibrador foi composto de cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de amostras de sangue de 7 voluntários saudáveis. O resultado é expresso em unidades arbitrárias, devendo ser interpretado como a quantidade de vezes que o gene de interesse (I- $\kappa$ B $\alpha$ ) encontra-se expresso em relação ao controle endógeno e em relação a indivíduos saudáveis. O controle endógeno (GUS- $\beta$ ) é um gene cuja expressão permanece constante na presença de estados mórbidos. A variabilidade intra-ensaio foi de 0,92% para o I- $\kappa$ B $\alpha$  e de 0,61% para o GUS- $\beta$ .

### **3.9. Diagnóstico ecocardiográfico de disfunção miocárdica**

Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos à ecocardiografia transtorácica bidimensional nas primeiras 24 horas após a admissão, e durante a internação na UTIP conforme a disponibilidade do serviço, até a suspensão das drogas vasoativas ou óbito, para avaliação da função miocárdica. A função sistólica do VE foi avaliada pela fração de encurtamento ( $\Delta d\%$ ), volumes ventriculares e fração de ejeção (FE). Os cálculos foram feitos de acordo com equações descritas previamente (OH et al., 1994). Os exames foram realizados por 3 ecocardiografistas experientes, utilizando os aparelhos Phillips® SONOS 5500 (Phillips Electronics North America Corporation, Andover, MA, USA) e HP Sonos 2500 (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, USA). Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com a FE < 50% (grupo 1) ou  $\geq$  50% (grupo 2).

### Fração de encurtamento ( $\Delta d\%$ )

A  $\Delta d\%$  do VE foi obtida utilizando-se o modo M (medida linear). Corresponde à variação percentual do diâmetro ventricular durante a sístole (Equação 1).

$$\Delta d\% = (DDVE - DSVE) / DDVE \times 100$$

Equação 1. Cálculo da fração de encurtamento ( $\Delta d\%$ ). Legenda: DDVE= diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo; DSVE= diâmetro sistólico de ventrículo esquerdo. Valor normal: acima de 30%.

### Volumes ventriculares

Para estimar o volume diastólico ou sistólico do VE, foi utilizado o método de Teicholz, utilizando-se os diâmetros obtidos no Modo M (DDVE e DSVE) (Equação 2).

$$V_{\text{diastólico}} = (DDVE^3 \times 7) / (DDVE + 2,4) \quad \text{e} \quad V_{\text{sistólico}} = (DSVE^3 \times 7) / (DSVE + 2,4)$$

Equação 2. Cálculo dos volumes ventriculares pelo método de Teicholz. Legenda: DDVE= diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo; DSVE= diâmetro sistólico de ventrículo esquerdo.

### Fração de ejeção (FE)

A fração de ejeção foi calculada a partir dos volumes ventriculares. Corresponde à variação percentual dos volumes ventriculares durante a sístole (Equação 3).

$$FE = (V_{\text{diastólico}} - V_{\text{sistólico}}) / V_{\text{diastólico}}$$

Equação 3. Cálculo da fração de ejeção (FE). Legenda:  $V_{\text{diastólico}}$ = volume diastólico do ventrículo esquerdo;  $V_{\text{sistólico}}$ = volume sistólico do ventrículo esquerdo. Valor normal  $\geq 65\%$  para o método do Cubo ou  $\geq 55\%$  para o método de Simpson ou  $\geq 50\%$  para o método de Teicholz.

O débito sistólico foi calculado subtraindo-se o volume sistólico do volume diastólico, obtendo-se o volume ejetado em cada sístole ventricular. Multiplicando-se este valor pela frequência cardíaca, obtivemos o débito cardíaco (DC) em l/min. O Índice Cardíaco (IC) foi calculado dividindo-se o débito cardíaco pela superfície corpórea do paciente, sendo expresso em l/min/m<sup>2</sup>. O índice sistólico (IS) foi obtido dividindo-se o débito sistólico pela superfície corpórea, sendo expresso em ml/m<sup>2</sup>. O volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE) foi ajustado para a superfície corporal (VDFVEa) (BROWN, 2002; OH et al., 1994).

### **3.10. Exames laboratoriais gerais**

Os exames laboratoriais gerais foram realizados pelos laboratórios de urgência do HC-FMRP-USP, unidades Campus e Unidade de Emergência, segundo procedimentos padronizados. A gasometria arterial e a dosagem do lactato arterial foram realizadas em sangue colhido em seringas contendo heparina lítica, utilizando-se o aparelho Rapidlab 860 (Bayer AG, Leverkusen).

### **3.11. Coleta de dados clínicos**

Para todos os pacientes incluídos no estudo foram coletados dados de prontuário para detecção de morbidade associada, uso de drogas vasopressoras e/ou inotrópicas, tempo de ventilação mecânica, tempo de internação e mortalidade, entre outros. Esses dados encontram-se na ficha de coleta de dados (ver apêndice 8.1). O escore PRISM (*Pediatric Risk of Mortality* – ver anexo 9.10) foi avaliado nas primeiras 12 horas da admissão na UTIP (POLLACK et al., 1988). Também foi avaliada a presença de disfunção de múltiplos órgãos



por meio do escore PELOD (*Paediatric Logistic Organ Dysfunction* – ver anexo 9.13) (LETEURTRE et al., 2003). O grau de suporte inotrópico utilizado foi estimado através de um escore inotrópico, assim calculado: dose de dopamina + dose de dobutamina + dose de milrinone x 10 + dose de adrenalina x 100 + dose de noradrenalina x 100 (WERNOVSKY et al., 1995).

### **3.12. Análise estatística**

Os resultados estão expressos como mediana (variação) ou n (%). As comparações entre os grupos foram feitas utilizando-se o teste U de Mann-Whitney para comparação de variáveis contínuas, e o teste exato de Fisher para variáveis categóricas. Comparações no mesmo grupo foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Testes de correlação entre duas variáveis contínuas foram feitos pelo coeficiente de correlação de Spearman. A expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  foi dividida arbitrariamente em dois grupos (menor que a mediana e maior ou igual à mediana). Foram utilizados os programas estatísticos SPSS® 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e Graphpad Prism® 5.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). Alguns gráficos estão representados em escala logarítmica apenas para melhor visualização dos pontos. Os dados, entretanto, não sofreram transformação logarítmica para a análise estatística. Foram considerados significantes os resultados quando  $p < 0,05$ .

## **4. Resultados**

### **4.1. Dados demográficos e epidemiológicos**

Foram estudados 15 pacientes (53% do sexo masculino) admitidos na UTIP entre maio de 2007 e novembro de 2008, todos com o diagnóstico de choque séptico segundo os critérios do consenso internacional sobre sepse pediátrica (GOLDSTEIN et al., 2005). Os pacientes tiveram seus dados coletados durante o tempo mediano de 6 dias (variação: 2-13 dias), com um total de 98 amostras coletadas. Os dados demográficos, diagnósticos, comorbidades, complicações e desfechos estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados demográficos, diagnósticos e comorbidades.

No.	Grupo	Sexo	Idade (meses)	Peso (kg)	Diagnóstico	Comorbidades	PRISM	Agente etiológico	Complicações	Uso de glicocorticóides (início)	Tempo de internação (dias)	Desfecho
1	1	M	9,7	6	Pneumonia	Miopatia a esclarecer, imunodeficiência celular	9	<i>Acinetobacter baumanii</i>	IRA, SDRA, IAdr, CConv, AVC, CIVD, Infec2	Sim (D4)	248	Alta
2	1	F	174,8	33	Meningoencefalite + Pneumonia	PO tardio de ressecção de tumor de SNC, Déficit de GH e hCG, DVP, paresia MSE	6	Indeterminada	IRA, SDRA, IAdr, AVC, CIVD, Infec2	Sim (D0)	17	Óbito
3	1	M	2,5	4	Pneumonia aspirativa		15	<i>Haemophilus spp</i> (sorotipo 2)	IAdr, Infec2, HP	Sim (D1)	38	Alta
4	2	F	131,9	42	Pneumonia com empiema		18	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	IAdr, Infec2	Sim (D0)	28	Alta
5	2	M	16,6	8,7	Infecção relacionada a cateter venoso central	Síndrome de Down, PO recente de ressecção de bridas intraperitoneais	23	<i>Staphylococcus aureus</i>	IRA, SDRA, CIVD, Infec2, abscessos pulmonares	Sim (D13)	64	Alta

(continua)

(continuação)												
6	1	F	113,5	40	Infecção de membro com fixador externo	Deformidade congênita do fêmur D, pé eqüino D	3	Indeterminada	SDRA	Não	15	Alta
7	2	M	213,6	113	Pneumonia + Síndrome do choque tóxico	Síndrome de Down, obesidade mórbida, PO recente de herniorrafia epigástrica	25	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	IRA, SDRA, IAdr, CIVD, Infec2	Sim (D0)	30	Óbito
8	1	M	142,9	40	Diarréia infecciosa	Toxoplasmose congênita, epilepsia, uso de dieta cetogênica	15	Indeterminada	IRA, IAdr, CIVD	Sim (D2)	11	Óbito
9	1	M	13,3	11,3	Abdômen agudo infeccioso + Fsseíte necrosante de parece abdominal e MIE		13	<i>Staphylococcus aureus</i>	IRA, IAdr, CIVD, Infec2	Sim (D2)	95	Ainda internado
10	2	F	215,3	25	Pneumonia aspirativa	RDNPM, epilepsia	8	<i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolítico + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CConv, CIVD	Sim (D4)	56	Alta
(continua)												

(conclusão)												
11	2	F	18,5	10	Diarréia aguda infecciosa	Hipotonia a esclarecer	10	Indeterminada	CConv	Não	17	Alta
12	2	M	140,9	50	Meningoencefalite		9	<i>Neisseria meningitidis</i> (sorotipo C)	CConv	Sim (D0)	11	Alta
13	1	F	22,6	11,4	Síndrome do choque tóxico		20	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Enterobacter cloacae</i>	IRA, IAdr, CConv, CIVD, necrose de extremidades	Sim (D1)	39	Ainda internado
14	1	F	62,5	22,0	Pneumonia	Hepatopatia crônica com cirrose e hipertensão portal	19	Indeterminada	SDRA, IAdr, CIVD	Sim (D0)	1	Óbito
15	1	M	4,0	2,2	Pneumonia	Colestase a esclarecer (fibrose cística?)	23	<i>Acinetobacter Baumannii</i>	IRA, IAdr, CIVD	Sim (D3)	9	Óbito
Mediana			62,5	22,0			15				28	

Legenda: PO= pós-operatório; SNC= sistema nervosa central; GH= hormônio do crescimento; hCG= gonadotrofina coriônica humana; DVP= derivação ventrículo-peritoneal; MSE= membro superior esquerdo; MIE= membro inferior esquerdo; D= direito; RDNPM= retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor; M= sexo masculino; F= sexo feminino; IRA= insuficiência renal aguda; SDRA= síndrome do desconforto respiratório agudo; IAdr= insuficiência adrenal; CConv= crises convulsivas inéditas; AVC= acidente vascular cerebral; CIVD= coagulação vascular disseminada; Infec2= infecção secundária; HP= hipertensão arterial pulmonar.

Nove (60%) pacientes apresentaram FE < 50% no primeiro dia de internação, preenchendo critério para disfunção miocárdica e sendo alocados no grupo 1. Os demais pacientes (N=6, 40%) foram alocados no grupo 2.

Não houve diferença entre a idade dos pacientes dos grupos de estudo (grupo 1: mediana de 22 meses (variação 2-174 meses) vs. grupo 2: mediana de 136 meses (variação 16-215 meses); p=0,12). Também não houve diferença no escore PRISM (grupo 1: mediana de 15 (variação 3-23) vs. grupo 2: mediana de 14 (variação 8-25); p=0,63).

## 4.2. Parâmetros ecocardiográficos

A fração de ejeção (FE) mediana no primeiro dia de internação foi de 41% (variação de 22-48%) no grupo 1 e de 60% (variação de 50-77%) no grupo 2, havendo variação significativa ao longo dos dias (p=0,01) (Tabela 2, Figura 1). A FE foi significativamente mais baixa no grupo 1 no 2º (p=0,04) e 6º (p=0,03) dias de evolução.

Tabela 2 – Valores da mediana (e variação) da fração de ejeção (%) durante o período de estudo.

Dia	Fração de ejeção (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	41 (22-48)	60 (50-77)	47 (22-77)
2	52 (27-67)	65 (52-80)	59 (27-80)
3	54 (29-82)	70 (56-82)	65 (29-82)
4	54 (40-70)	72 (41-83)	67 (40-83)
5	68 (60-70)	80 (65-82)	69 (60-82)
6	64 (41-77)	81 (71-82)	70 (41-82)
7	70 (63-81)	72 (65-79)	69 (63-81)
8	67	71	69 (67-71)
9	67	77	72 (67-77)
10	67	82	74 (67-82)
11	-	82	82
12	-	81	81
13	-	82	82

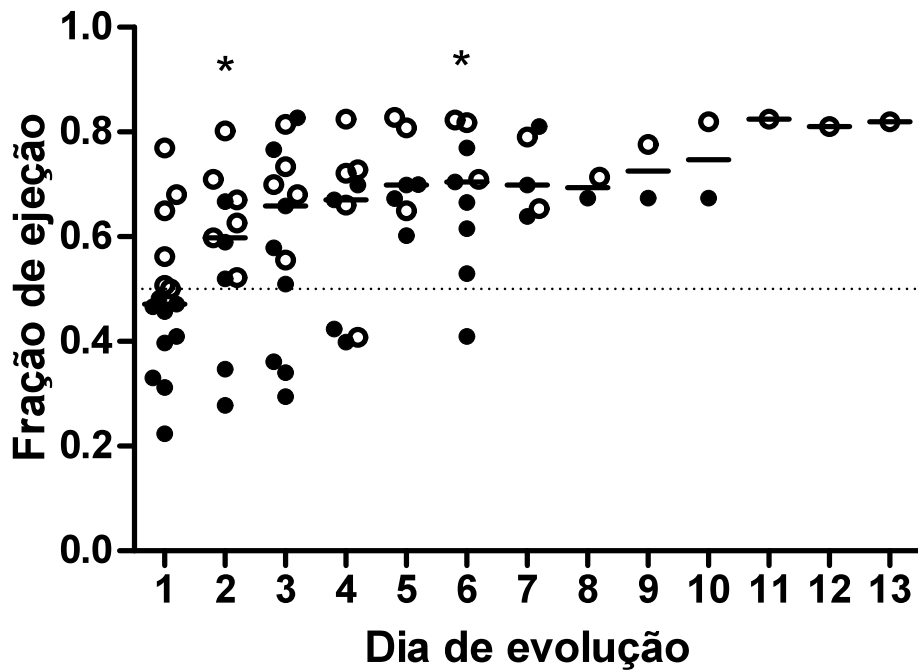


Figura 1. Fração de ejeção (%) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes. \*= diferença significativa entre os grupos.

A mediana da fração de encurtamento, ou  $\Delta d\%$ , no primeiro dia de evolução foi de 18% (variação de 9-23%) no grupo 1 e de 32% (variação de 25-43%) no grupo 2, apresentando variação significativa com o tempo ( $p=0,03$ ) (Tabela 3, Figura 2). A fração de encurtamento foi significativamente mais baixa nos pacientes do grupo 1 no 1º ( $p=0,001$ ), 2º ( $p=0,04$ ) e 6º ( $p=0,03$ ) dias de evolução.

Tabela 3 – Valores da mediana (e variação) da fração de encurtamento ( $\Delta d\%$ ) durante o período de estudo.

Dia	Fração de encurtamento ( $\Delta d\%$ )		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	18 (9-23)	32 (25-43)	22 (9-43)
2	25 (12-36)	37 (26-45)	30 (12-45)
3	26 (13-48)	39 (28-47)	34 (13-48)
4	27 (18-38)	40 (19-48)	36 (18-48)
5	36 (31-38)	48 (36-48)	37 (31-48)
6	33 (19-44)	47 (40-50)	37 (19-50)
7	36 (33-48)	40 (34-48)	36 (33-48)
8	37	38	37 (37-38)
9	37	43	40 (37-43)
10	37	47	42 (37-47)
11	-	48	48
12	-	46	46
13	-	47	47

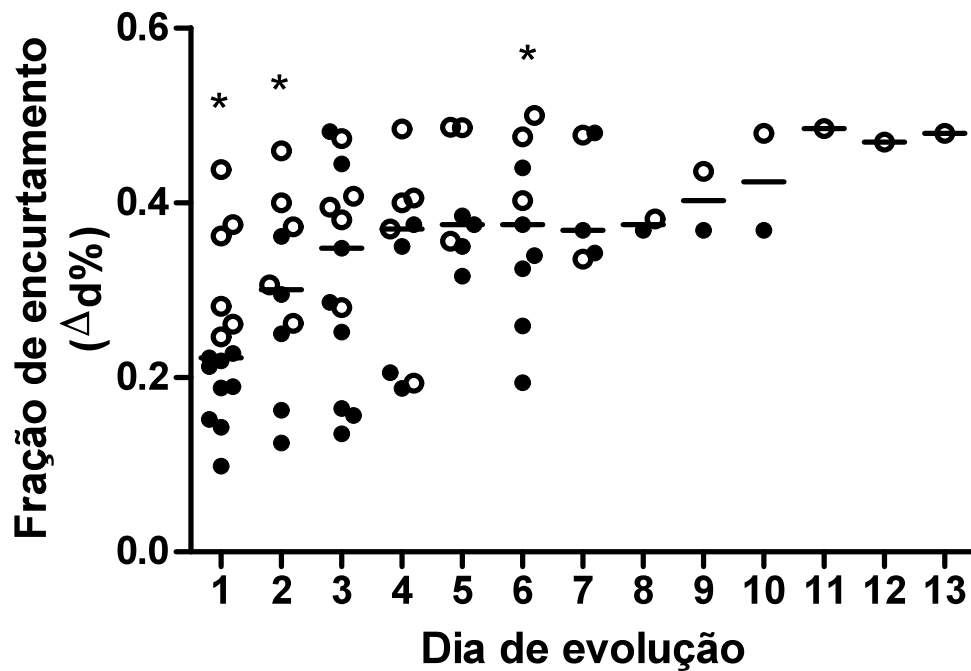


Figura 2. Fração de encurtamento ( $\Delta d\%$ ) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes. \*= diferença significativa entre os grupos.



A mediana do VDFVEa, no primeiro dia, foi de 45 ml/m<sup>2</sup> (variação de 32-93 ml/m<sup>2</sup>) no grupo 1 e de 60 ml/m<sup>2</sup> (variação de 17-85 ml/m<sup>2</sup>) no grupo 2. A variação temporal não foi significativa (p=0,57) (Tabela 4, Figura 3). O VDFVEa não diferiu significativamente entre os pacientes dos dois grupos em nenhum dos tempos estudados. Não houve diferença no VDFVEa entre pacientes que sobreviveram ou não.

Tabela 4 – Valores da mediana (e variação) do volume diastólico final do ventrículo esquerdo ajustado para a área de superfície corporal (VDFVEa, em ml/m<sup>2</sup>) durante o período de estudo.

Dia	Volume diastólico final do ventrículo esquerdo (ml/m <sup>2</sup> )		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	45 (32-93)	60 (17-85)	53 (17-93)
2	45 (24-93)	74 (45-79)	45 (24-93)
3	43 (24-83)	51 (29-78)	45 (24-83)
4	43 (26-73)	51 (47-78)	47 (26-78)
5	39 (24-73)	47 (47-48)	40 (24-73)
6	37 (23-73)	43 (31-45)	38 (23-73)
7	38 (26-64)	45 (43-48)	43 (26-64)
8	27	48	38 (27-48)
9	28	48	38 (28-48)
10	27	48	38 (27-48)
11	27	-	27
12	27	-	27
13	27	-	27

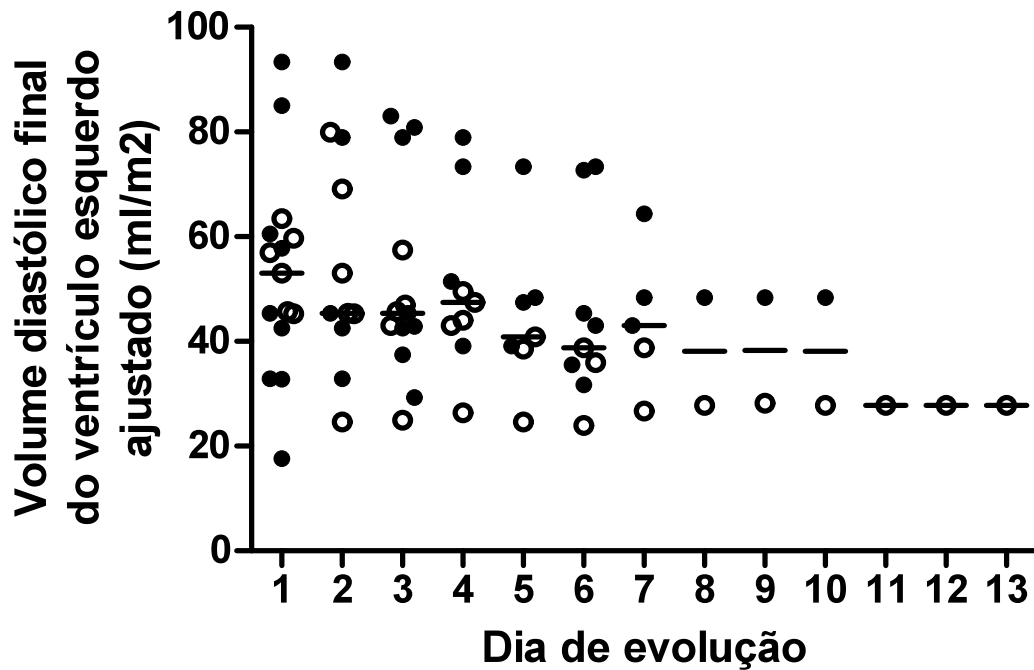


Figura 3. Volume diastólico final do ventrículo esquerdo ajustado pela superfície corporal ( $\text{ml}/\text{m}^2$ ) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

Em relação à medida do índice sistólico, os valores da mediana no primeiro dia foram de  $18,8 \text{ ml}/\text{m}^2$  (variação de  $7,3\text{-}45,0 \text{ ml}/\text{m}^2$ ) no grupo 1 e de  $32,7 \text{ ml}/\text{m}^2$  (variação de  $14,8\text{-}43,9 \text{ ml}/\text{m}^2$ ) no grupo 2. Não houve variação significativa com o tempo ( $p=0,96$ ) (Tabela 5, Figura 4). Não houve diferenças entre os pacientes dos dois grupos em nenhum dos tempos estudados.

Tabela 5 – Valores da mediana (e variação) do índice sistólico ( $\text{ml}/\text{m}^2$ ) durante o período de estudo.

Dia	Índice sistólico ( $\text{ml}/\text{m}^2$ )		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	18,8 (7,3-45,0)	32,7 (14,8-43,9)	22,9 (7,3-45,0)
2	22,00 (15,8-48,6)	34,1 (19,7-50,1)	28,3 (15,8-50,1)
3	27,6 (13,4-48,1)	29,4 (20,4-42,2)	28,2 (13,4-48,1)
4	29,4 (21,9-49,4)	28,8 (20,2-34,6)	28,8 (20,2-49,4)
5	31,4 (27,4-49,4)	26,6 (20,3-31,2)	29,1 (20,3-49,4)
6	30,6 (14,6-51,8)	27,6 (19,6-29,6)	28,0 (14,6-51,8)
7	35,0 (30,1-45,0)	24,1 (17,5-30,8)	31,0 (17,5-45,0)
8	32,6	19,9	26,2 (19,9-32,6)
9	32,6	21,9	27,2 (21,9-32,6)
10	32,6	22,8	27,7 (22,8-32,6)
11	-	22,9	22,9
12	-	22,5	22,5
13	-	22,8	22,8

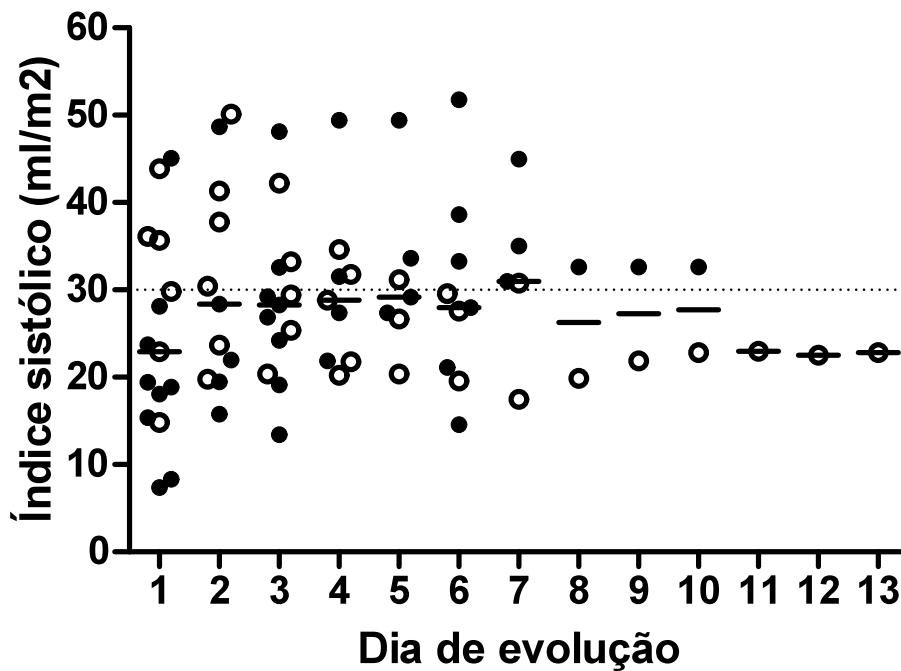


Figura 4. Índice sistólico ( $\text{ml}/\text{m}^2$ ) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

Quanto à medida do índice cardíaco, os valores da mediana no primeiro dia foram de 2,7 l/min/m<sup>2</sup> (variação de 1,3-5,9 l/min/m<sup>2</sup>) no grupo 1, e de 4,4 l/min/m<sup>2</sup> (variação de 0,8-4,7 l/min/m<sup>2</sup>) no grupo 2. Não houve variação significativa ao longo do tempo (p=0,99) (Tabela 6, Figura 5). Não houve diferença entre o IC dos grupos estudados em nenhum dos tempos avaliados.

Tabela 6 – Valores da mediana (e variação) do índice cardíaco (l/min/m<sup>2</sup>) durante o período de estudo.

Dia	Índice cardíaco (l/min/m <sup>2</sup> )		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	2,7 (1,3-5,9)	4,4 (0,8-4,7)	2,9 (0,8-5,9)
2	2,9 (2,0-5,0)	3,8 (2,4-6,3)	2,9 (2,0-6,3)
3	3,9 (1,3-6,5)	3,7 (2,7-6,1)	3,8 (1,3-6,5)
4	4,1 (2,1-8,7)	3,5 (2,5-4,9)	3,4 (2,1-8,7)
5	3,8 (2,6-4,7)	3,1 (2,7-3,9)	3,0 (2,6-4,7)
6	4,0 (2,1-5,4)	2,7	3,4 (2,1-5,4)
7	4,8 (4,2-7,1)	2,9 (2,6-3,2)	4,1 (2,6-7,1)
8	3,4	2,9	3,2 (2,9-3,4)
9	3,7	3,0	3,4 (3,0-3,7)
10	3,8	3,4	3,6 (3,4-3,8)
11	-	3,1	3,1
12	-	3,2	3,2
13	-	3,5	3,5

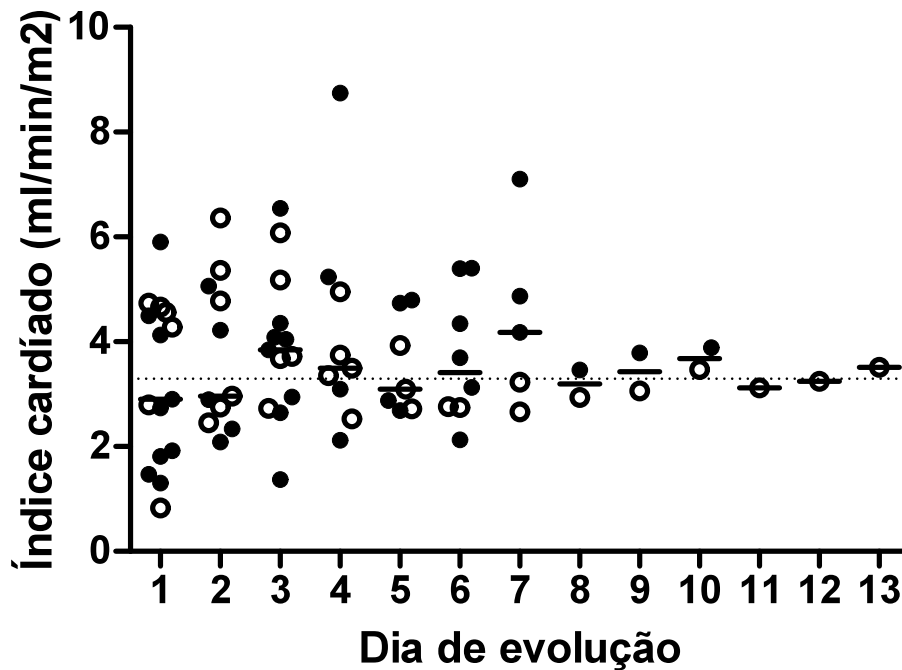


Figura 5. Índice cardíaco ( $l/min/m^2$ ) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

### 4.3. Marcadores inflamatórios e cardíacos

A concentração plasmática mediana de cTnI no 1º dia de internação foi  $<0,01$  ng/ml (variação  $<0,01$ -2,6 ng/ml) no grupo 1 e  $<0,01$  ng/ml (variação  $<0,01$ -4,5 ng/ml) no grupo 2. Alguns pacientes apresentaram elevação da cTnI durante todo o período de estudo (pacientes 1, 5, 7 e 14), outros apresentaram elevação transitória (pacientes 2, 3 e 13), e os demais não apresentaram elevação da cTnI. Não houve variação significativa dos valores ao longo do tempo ( $p=0,84$ ) (Tabela 7, Figura 6). Não houve diferença entre as concentrações de cTnI entre os pacientes dos dois grupos de estudo em nenhum dos tempos avaliados.

Tabela 7 – Valores da mediana (e variação) da concentração plasmática de troponina I cardíaca (pg/ml) durante o período de estudo.

Dia	Troponina I cardíaca (ng/ml)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	< 0,01 (<0,01-2,6)	< 0,01 (<0,01-4,5)	< 0,01 (<0,01-4,5)
2	< 0,01 (<0,01-1,7)	< 0,01 (<0,01-2,4)	< 0,01 (<0,01-2,4)
3	< 0,01 (<0,01-1,3)	< 0,01 (<0,01-3,0)	< 0,01 (<0,01-3,0)
4	< 0,01 (<0,01-0,7)	< 0,01 (<0,01-3,4)	< 0,01 (<0,01-3,4)
5	< 0,01 (<0,01-0,4)	< 0,01 (<0,01-2,5)	< 0,01 (<0,01-2,5)
6	< 0,01 (<0,01-0,3)	< 0,01 (<0,01-3,0)	< 0,01 (<0,01-3,0)
7	< 0,01 (<0,01-0,3)	1,3 (<0,01-2,5)	< 0,01 (<0,01-2,5)
8	< 0,01	2,5	< 0,01 (<0,01-2,5)
9	< 0,01	3,7	< 0,01 (<0,01-3,7)
10	0,05 (<0,01-0,09)	2,0	0,09 (<0,01-2,0)
11	0,08 (<0,01-0,16)	3,0	0,16 (<0,01-3,0)
12	< 0,01	5,8	2,90 (<0,01-5,8)
13	0,16	6,0	3,11 (0,16-6,0)

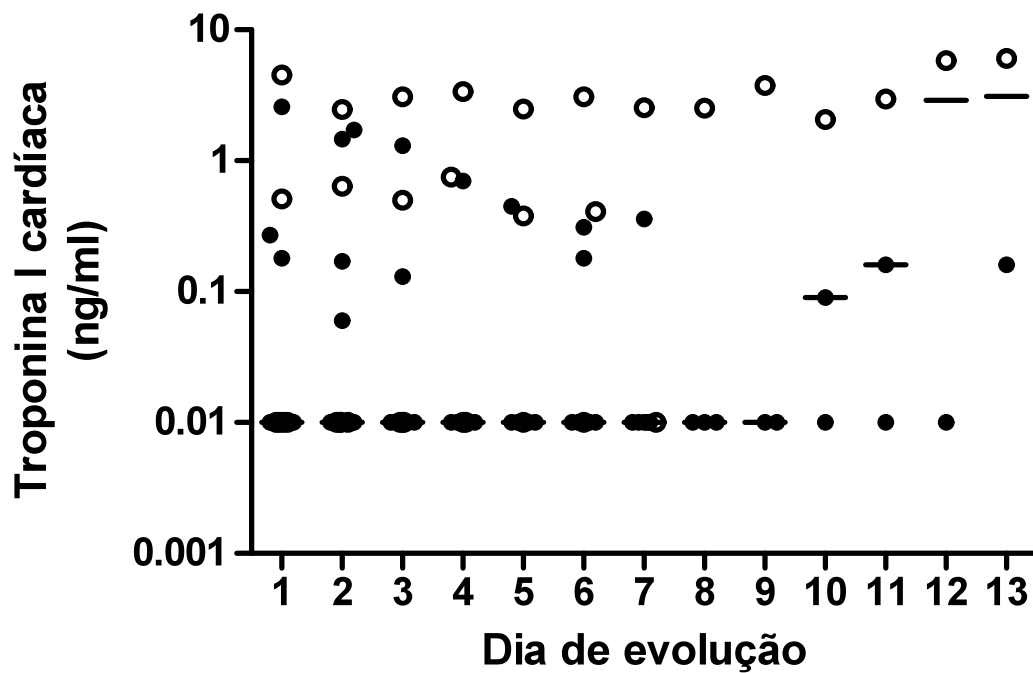


Figura 6. Concentração plasmática de troponina I cardíaca (ng/ml, em escala logarítmica) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

A concentração plasmática mediana do BNP no primeiro dia de internação foi de 308 pg/ml (variação de 5-1680 pg/ml) no grupo 1 e de 200 pg/ml (variação de 136-487 pg/ml) no grupo 2. Os valores medianos mantiveram-se acima do valor de referência (100 pg/ml) durante todo o período de estudo, com exceção do 12º dia. Não houve variação significativa das concentrações do BNP ao longo dos dias ( $p=0,70$ ) (Tabela 8, Figura 7). As concentrações do BNP não diferiram significativamente entre os dois grupos em nenhum dos momentos estudados.

Tabela 8 – Valores da mediana (e variação) da concentração plasmática do peptídeo natriurético tipo B (pg/ml) durante o período de estudo.

Dia	Peptídeo natriurético tipo B (pg/ml)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	308 (5-1680)	200 (136-487)	224 (5-1680)
2	679 (6-1640)	172 (22-350)	263 (6-1640)
3	466 (10-2030)	122 (5-334)	327 (5-2030)
4	739 (57-2450)	255 (5-378)	341 (5-2450)
5	225 (25-2110)	253 (160-1390)	239 (25-2110)
6	481 (70-3830)	211 (159-702)	358 (70-3830)
7	273 (42-2240)	267 (133-402)	273 (42-2240)
8	1130 (254-1540)	92	692 (92-1540)
9	890	181	712 (181-890)
10	522 (220-825)	269	269 (220-825)
11	577 (145-1010)	302	302 (145-1010)
12	27	19	23 (19-27)
13	371	61	216 (61-371)

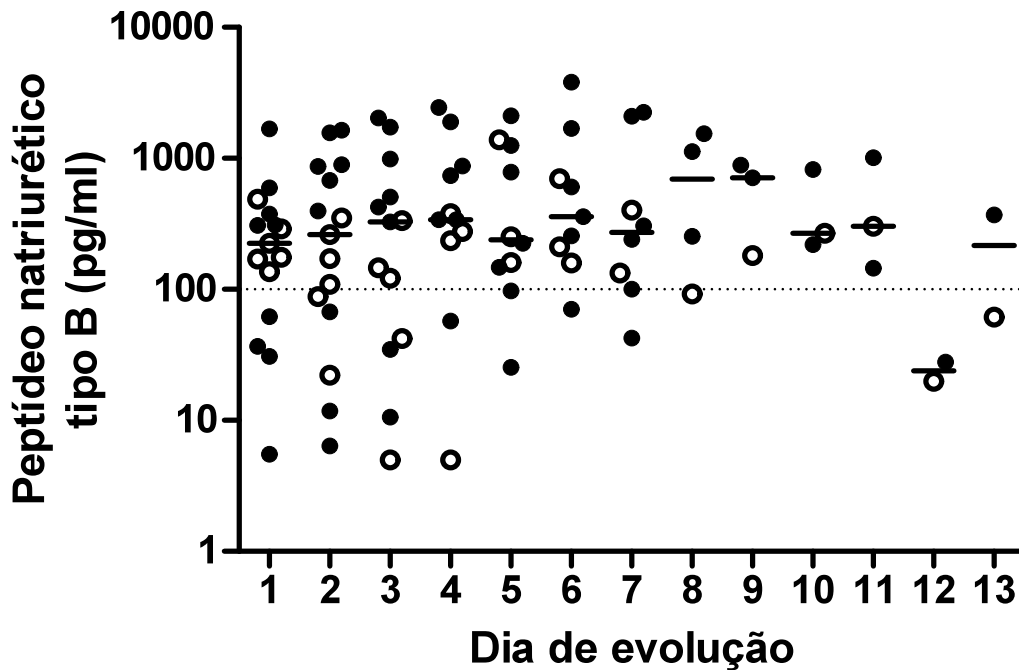


Figura 7. Concentração plasmática do peptídeo natriurético tipo B (pg/ml, em escala logarítmica) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

Ao analisarmos a expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ , refletindo a ativação do NF- $\kappa$ B, verificamos que a maioria dos pacientes apresentava, no 1º dia da internação, uma expressão aumentada, com mediana de 6,8 vezes maior em relação ao controle endógeno e em relação ao calibrador (indivíduos saudáveis). Os valores medianos mantiveram-se acima de 1, significando expressão aumentada, durante todo o período de estudo, com exceção do grupo 1 no 12º dia. Contudo, não houve variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,90$ ) (Tabela 9, Figura 8). Os valores obtidos no 1º dia ( $p=0,03$ ), 3º dia ( $p=0,01$ ) e 4º dia ( $p=0,03$ ) de evolução foram significativamente mais baixos nos pacientes do grupo 1.



Tabela 9 – Valores da mediana (e variação) da expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  (em unidades arbitrárias) durante o período de estudo.

Dia	Expressão do RNAm do I- $\kappa$ B $\alpha$		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	2,2 (0,3-11,2)	8,6 (6,8-15,3)	6,8 (0,3-15,3)
2	3,7 (0,1-26,8)	11,0 (5,8-29,4)	7,3 (0,1-26,8)
3	2,6 (0,2-11,4)	13,2 (3,2-23,2)	4,1 (0,2-23,2)
4	2,1 (0,01-7,4)	6,4 (5,9-9,9)	5,3 (0,01-9,9)
5	3,4 (0,6-18,6)	9,7 (6,2-11,8)	5,6 (0,6-18,6)
6	3,1 (0,4-7,2)	2,7 (2,2-18,8)	2,7 (0,4-18,8)
7	4,2 (0,1-13,8)	12,7 (4,6-20,8)	4,7 (0,1-20,8)
8	4,3 (0,8-6,1)	3,4	3,8 (0,8-6,1)
9	3,1 (2,1-4,1)	2,4	2,4 (2,1-4,1)
10	4,0 (1,3-6,8)	1,5	1,5 (1,3-6,8)
11	16,0 (0,2-32,0)	5,4	5,4 (0,2-32,0)
12	0,1	15,9	8,0 (0,1-15,9)
13	3,4	2,4	2,9 (2,4-3,4)

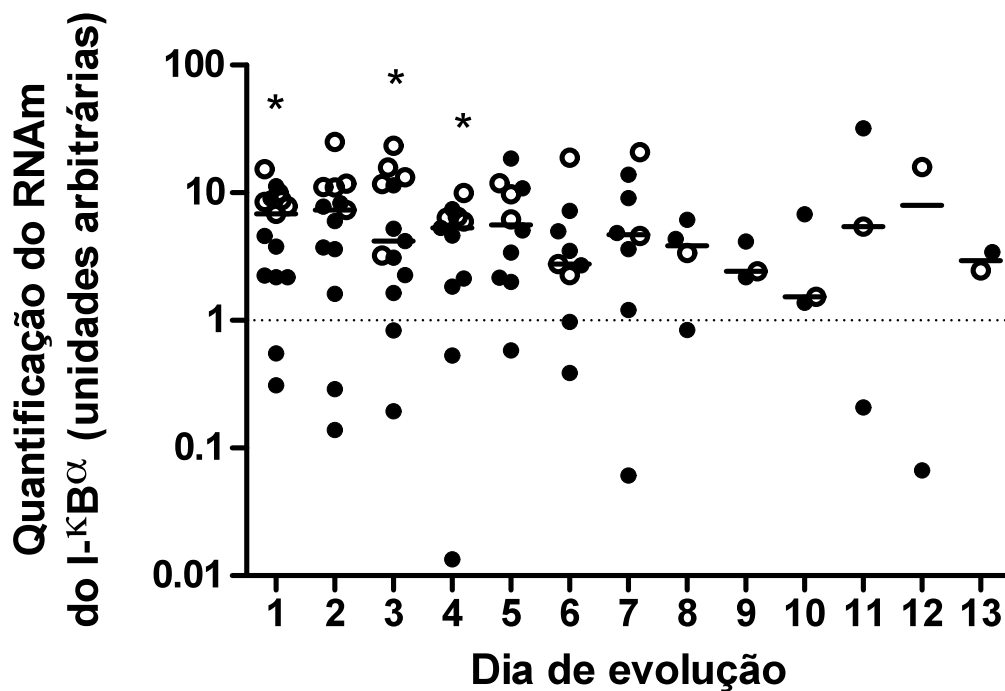


Figura 8. Expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  (unidades arbitrárias, em escala logarítmica) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes. \*= diferença significativa entre os grupos.

#### 4.4. Terapêutica cardiovascular

O grau de suporte inotrópico oferecido, calculado através do escore inotrópico, teve o valor mediano, no 1º dia da internação, de 20 (variação de 10-97) no grupo 1 e de 15 (variação de 7 a 102) no grupo 2. Não houve variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,49$ ) (Tabela 10, Figura 9). Os pacientes dos dois grupos não tiveram escores inotrópicos significativamente diferentes em nenhum dos tempos estudados.

Tabela 10 – Valores da mediana (e variação) do escore inotrópico durante o período de estudo.

Dia	Escore inotrópico		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	20 (10-97)	15 (7-102)	15 (7-102)
2	48 (12-97)	14 (5-178)	28 (5-178)
3	33 (10-138)	7 (0-68)	24 (0-138)
4	24 (0-121)	6 (0-60)	18 (0-121)
5	18 (7-118)	20 (0-50)	18 (0-118)
6	15 (0-118)	47 (32-62)	32 (0-118)
7	26 (0-88)	35 (0-70)	26 (0-88)
8	0 (0-73)	60	17 (0-73)
9	66 (55-78)	62	62 (55-78)
10	71 (55-88)	47	55 (47-88)
11	76 (55-98)	40	55 (40-98)
12	54 (0-108)	35	35 (0-108)
13	128	30	79 (30-128)

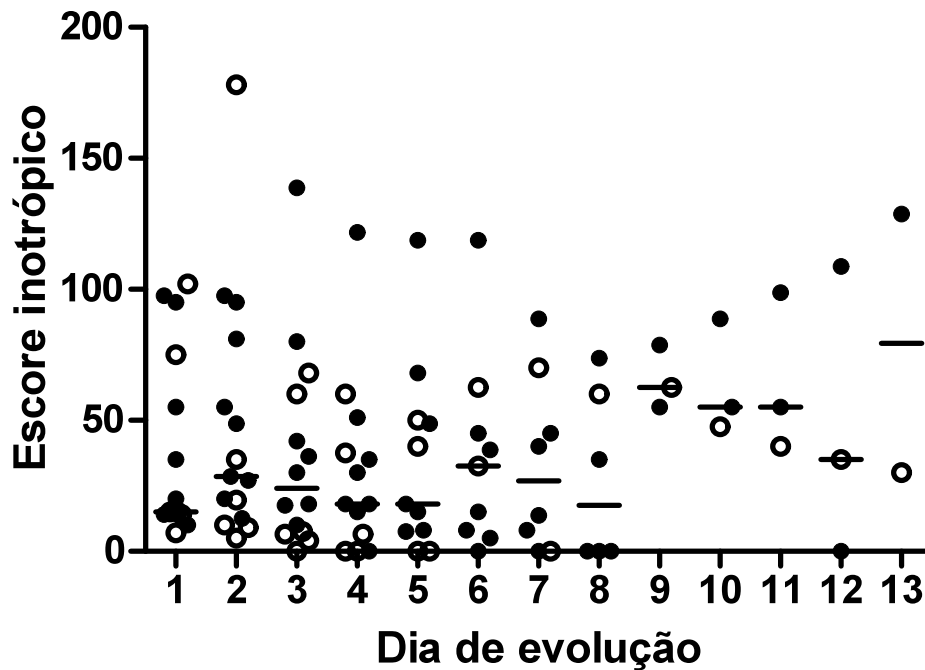


Figura 9. Escore inotrópico calculado durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

O volume mediano de líquidos administrado no primeiro dia de internação (incluindo volume de expansões, medicações, soro de manutenção e bolsas de manutenção de pressões invasivas) foi de 92 ml/kg (variação de 48-274 ml/kg) no grupo 1 e de 101 ml/kg (variação de 38-172 ml/kg) no grupo 2 (Tabela 11, Figura 10). Não houve variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,44$ ), e não houve diferenças entre os grupos em nenhum dos dias estudados.

Tabela 11 – Valores da mediana (e variação) do volume de fluidos recebido (ml/kg/dia) durante o período de estudo.

Dia	Volume recebido (ml/kg/dia)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	92 (48-274)	101 (38-172)	92 (38-274)
2	71 (40-141)	63 (27-137)	68 (27-141)
3	66 (32-122)	89 (18-132)	68 (18-132)
4	65 (20-176)	52 (11-145)	53 (11-176)
5	83 (30-116)	64 (16-90)	66 (16-116)
6	70 (29-106)	51 (14-88)	70 (14-106)
7	60 (33-124)	120	69 (33-124)
8	36 (26-86)	92	61 (26-92)
9	30 (25-36)	116	36 (25-116)
10	26 (23-29)	107	29 (23-107)
11	26 (22-30)	95	30 (22-95)
12	21	77	49 (21-77)
13	31	96	63 (31-96)

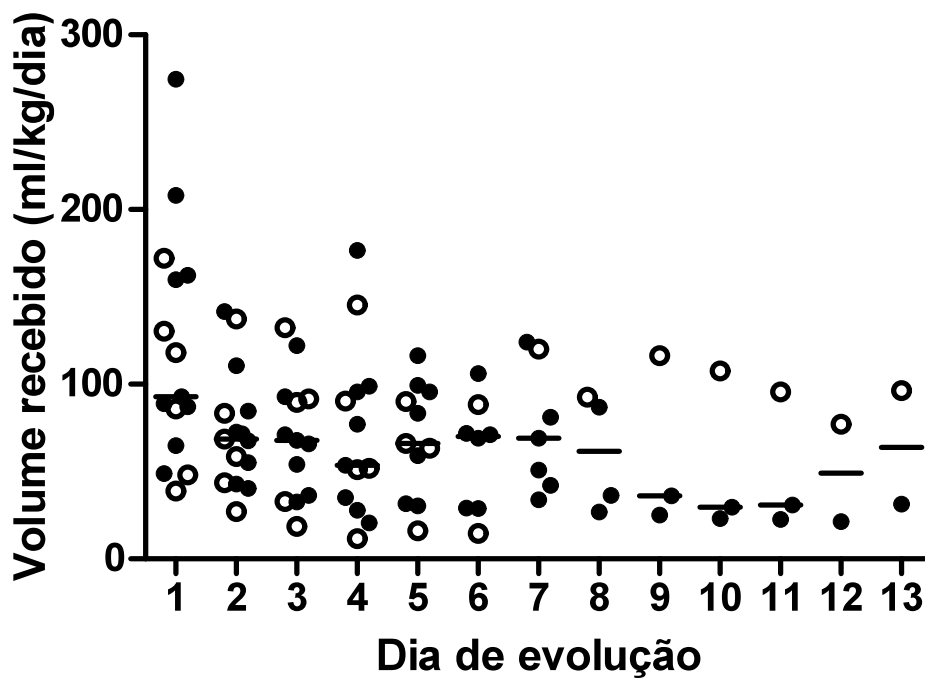


Figura 10. Volume de fluidos recebido (ml/kg/dia) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

A mediana da pressão venosa central no primeiro dia de internação foi de 9 mmHg (variação de 6-17 mmHg) no grupo 1 e de 10 mmHg (variação de 4-17 mmHg) no grupo 2, sem variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,44$ ) (Tabela 12, Figura 11). Não houve diferenças entre as medidas dos pacientes dos dois grupos em nenhum dos tempos estudados.

Tabela 12 – Valores da mediana (e variação) da pressão venosa central (mmHg) durante o período de estudo.

Dia	Pressão venosa central (mmHg)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	9 (6-17)	10 (4-17)	9 (4-17)
2	11 (7-18)	9 (5-19)	11 (5-19)
3	8 (5-15)	14 (3-19)	10 (3-19)
4	7 (4-19)	14 (8-21)	8 (4-21)
5	10 (7-12)	10 (3-25)	10 (3-25)
6	9 (8-19)	12 (6-18)	9 (6-19)
7	10 (3-12)	8	9 (3-12)
8	6 (4-9)	7	7 (4-9)
9	7 (6-8)	7	7 (6-8)
10	6 (5-8)	9	8 (5-9)
11	9 (8-10)	8	8 (8-10)
12	-	6	6
13	-	6	6

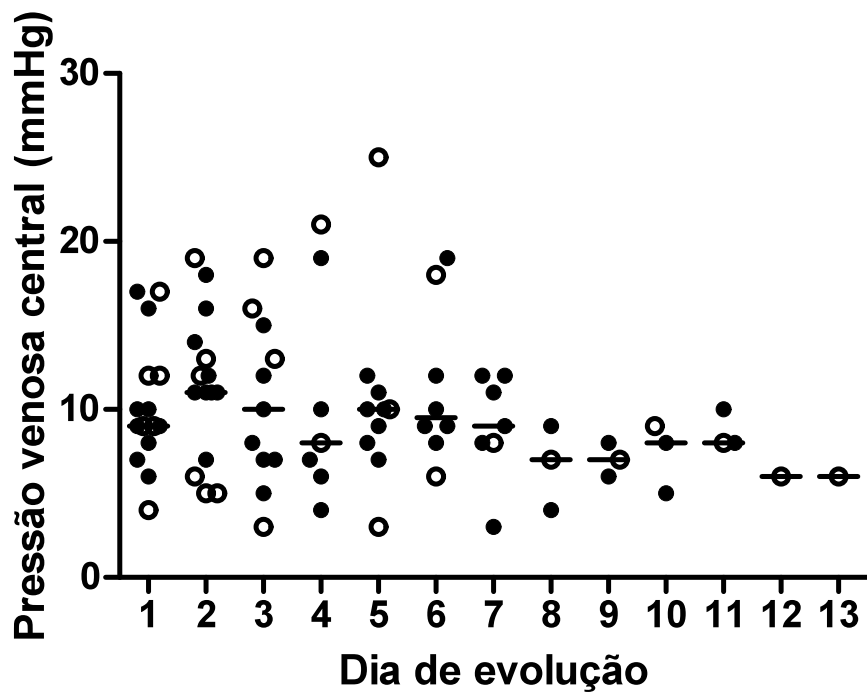


Figura 11. Pressão venosa central (mmHg) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

#### 4.5. Evolução clínica e laboratorial geral

A mediana da frequência cardíaca (FC) mediana dos pacientes no momento da internação foi de 142 bpm (variação de 115-186 bpm) no grupo 1 e de 140 bpm (variação de 62-174 bpm) no grupo 2, sem haver variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,99$ ) (Tabela 13, Figura 12). Não houve diferenças nos valores da FC entre os grupos em nenhum dos tempos estudados.

Tabela 13 – Valores da mediana (e variação) da frequência cardíaca (bpm) durante o período de estudo.

Dia	Frequência cardíaca (bpm)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	142 (115-186)	140 (62-174)	142 (62-186)
1	156 (99-200)	121 (56-153)	131 (56-200)
2	155 (102-192)	133 (55-157)	142 (55-192)
3	138 (102-162)	144 (112-176)	140 (102-176)
4	138 (97-177)	130 (110-154)	130 (97-177)
5	141 (92-151)	122 (102-152)	126 (92-152)
6	143 (84-162)	120 (100-140)	140 (84-162)
7	137 (120-158)	152	139 (120-158)
8	118 (106-168)	148	133 (106-168)
9	122 (116-129)	140	129 (116-140)
10	125 (119-132)	152	132 (119-152)
11	133 (121-146)	136	136 (121-146)
12	120	144	132 (120-144)
13	134	154	144 (134-154)

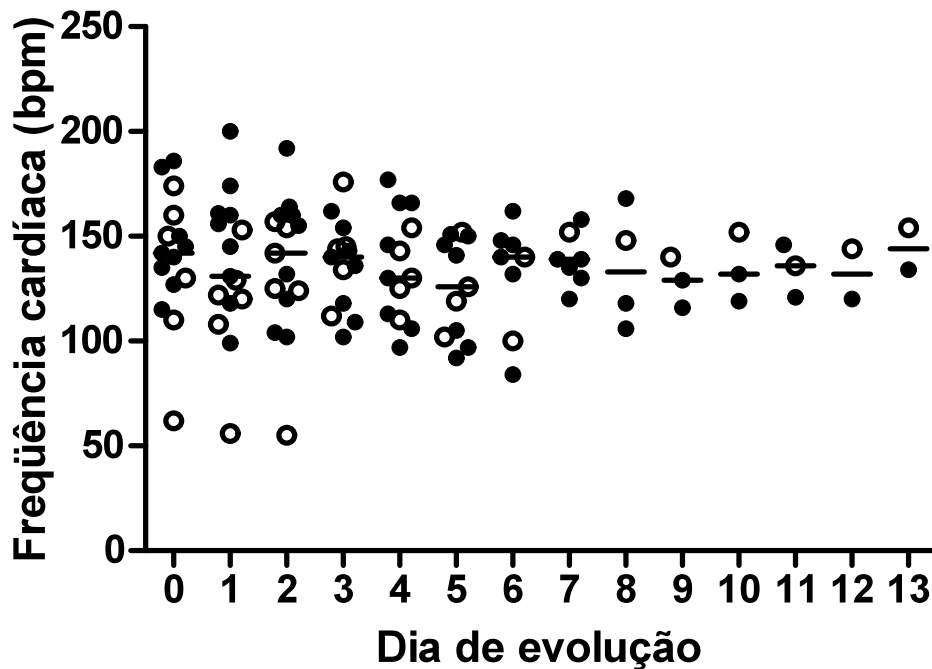


Figura 12. Frequência cardíaca (bpm) aferida durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

Ajustando-se os valores da FC para a idade dos pacientes (FCa), não observamos variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,99$ ) (Tabela 14, Figura 13). Ressalta-se, todavia, que as medianas e a maioria dos valores observados encontram-se acima de 1, indicando uma taquicardia mantida (FC maior do que o esperado para a idade). A FCa não diferiu entre os pacientes dos dois grupos em nenhum dos tempos estudados.

Tabela 14 – Valores da mediana (e variação) da frequência cardíaca ajustada para idade durante o período de estudo.

Dia	Frequência cardíaca ajustada		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	1,4 (0,9-1,9)	1,4 (0,8-2,1)	1,4 (0,8-2,1)
1	1,2 (0,9-2,6)	1,2 (0,7-2,0)	1,2 (0,7-2,6)
2	1,2 (0,8-2,1)	1,4 (0,7-2,1)	1,2 (0,7-2,1)
3	1,1 (0,8-2,0)	1,5 (1,0-2,3)	1,2 (0,7-2,3)
4	1,3 (0,9-1,9)	1,4 (1,1-1,7)	1,3 (0,8-1,9)
5	1,1 (0,7-1,9)	1,5 (1,2-1,7)	1,2 (0,7-1,9)
6	1,1 (0,6-1,9)	1,2 (1,1-1,3)	1,2 (0,6-1,9)
7	1,1 (0,9-1,8)	1,2	1,2 (0,9-1,8)
8	1,4 (1,3-1,6)	1,1	1,3 (1,1-1,6)
9	1,6 (1,5-1,7)	1,1	1,5 (1,1-1,7)
10	1,7 (1,6-1,8)	1,2	1,6 (1,2-1,7)
11	1,8 (1,6-1,9)	1,0	1,6 (1,0-1,9)
12	1,6	1,1	1,3 (1,1-1,6)
13	1,8	1,2	1,5 (1,2-1,8)



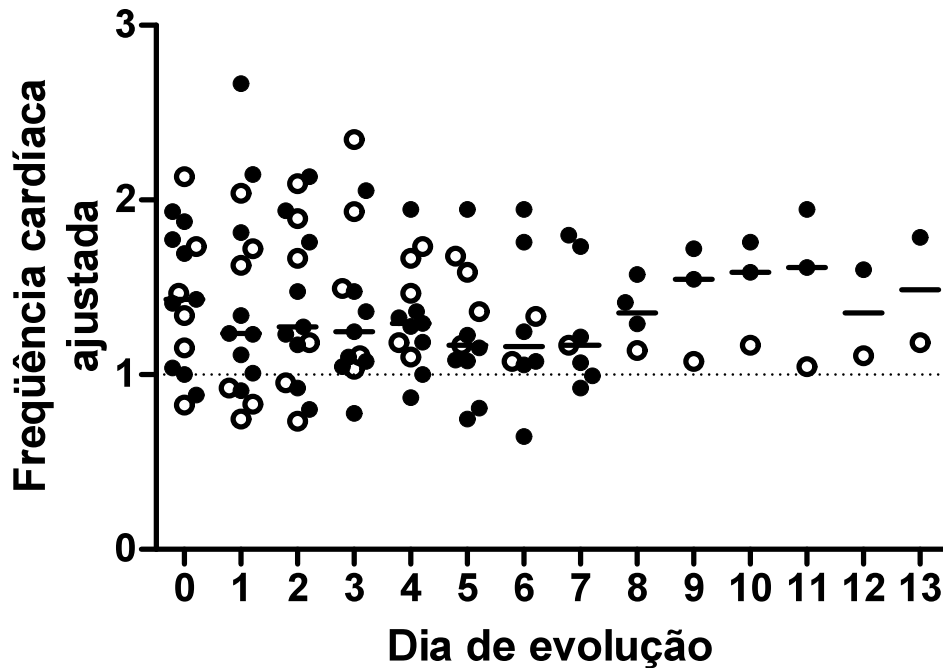


Figura 13. Frequência cardíaca ajustada para idade durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

A mediana da frequência respiratória (FR) dos pacientes no momento da internação foi de 37 irpm (variação de 21-56 irpm) no grupo 1, e de 28 irpm (variação de 25-36 irpm) no grupo 2, sem variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,90$ ) (Tabela 15, Figura 14). Não houve diferença na FR de pacientes dos dois grupos em nenhum dos tempos estudados.

Tabela 15 – Valores da mediana (e variação) da frequência respiratória (irpm) durante o período de estudo.

Dia	Frequência respiratória (irpm)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	37 (21-56)	28 (25-36)	33 (21-56)
1	35(24-45)	24 (18-40)	30 (18-45)
2	35 (14-45)	28 (17-50)	32 (14-50)
3	28 (15-40)	30 (20-48)	28 (15-48)
4	28 (15-45)	38 (20-40)	30 (15-45)
5	34 (18-45)	38 (18-44)	35 (18-45)
6	35 (21-46)	31 (23-40)	35 (21-46)
7	33 (26-40)	36	34 (26-40)
8	30 (25-35)	36	32 (25-36)
9	28 (16-40)	35	35 (16-40)
10	30 (28-33)	37	33 (28-37)
11	26 (18-35)	35	35 (18-35)
12	38	40	39 (38-40)
13	38	44	41 (38-44)

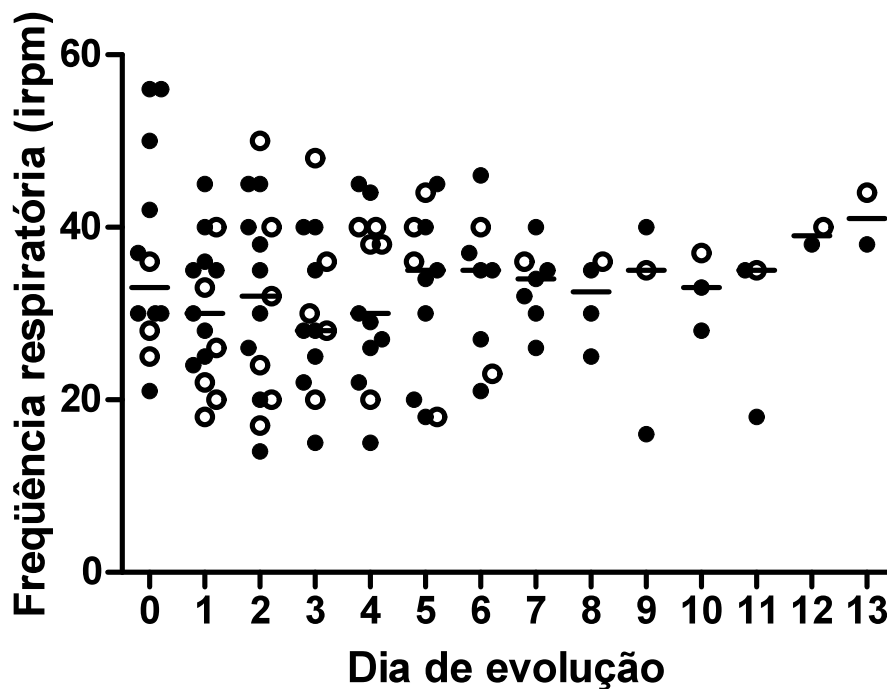


Figura 14. Frequência respiratória (irpm) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

Após ajustar-se a FR para a idade dos pacientes, observamos que a mediana no dia da internação era maior que 1 em ambos os grupos, indicando taquipnéia na maioria dos pacientes. Não houve variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,77$ ) (Tabela 16, Figura 15), e não houve diferença da FR ajustada entre os dois grupos em nenhum dos dias do estudo.

Tabela 16 – Valores da mediana (e variação) da frequência respiratória ajustada para idade durante o período de estudo.

Dia	Frequência respiratória ajustada		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	1,2 (0,7-3,0)	1,8 (1,1-2,0)	1,4 (0,6-3,0)
1	1,0 (0,6-2,6)	1,3 (0,7-1,6)	1,1 (0,6-2,6)
2	1,0 (0,6-1,8)	1,2 (1,0-2,1)	1,0 (0,6-2,1)
3	0,9 (0,6-2,0)	1,1 (0,9-3,4)	0,9 (0,6-3,4)
4	0,9 (0,6-2,1)	1,4 (1,2-2,7)	1,1 (0,6-2,7)
5	0,9 (0,5-2,5)	1,5 (1,3-2,6)	1,0 (0,5-2,6)
6	0,9 (0,8-2,8)	1,4 (1,2-1,6)	0,9 (0,8-2,5)
7	0,8 (0,7-2,3)	1,1	0,9 (0,7-2,3)
8	1,0 (0,9-2,5)	1,1	1,1 (0,9-2,5)
9	1,8 (0,7-2,8)	1,1	1,1 (0,7-2,8)
10	1,7 (1,1-2,3)	1,1	1,2 (1,1-2,3)
11	1,6 (0,8-2,5)	1,1	1,1 (0,7-2,5)
12	2,7	1,2	2,0 (1,2-2,7)
13	2,7	1,4	2,0 (1,4-2,7)

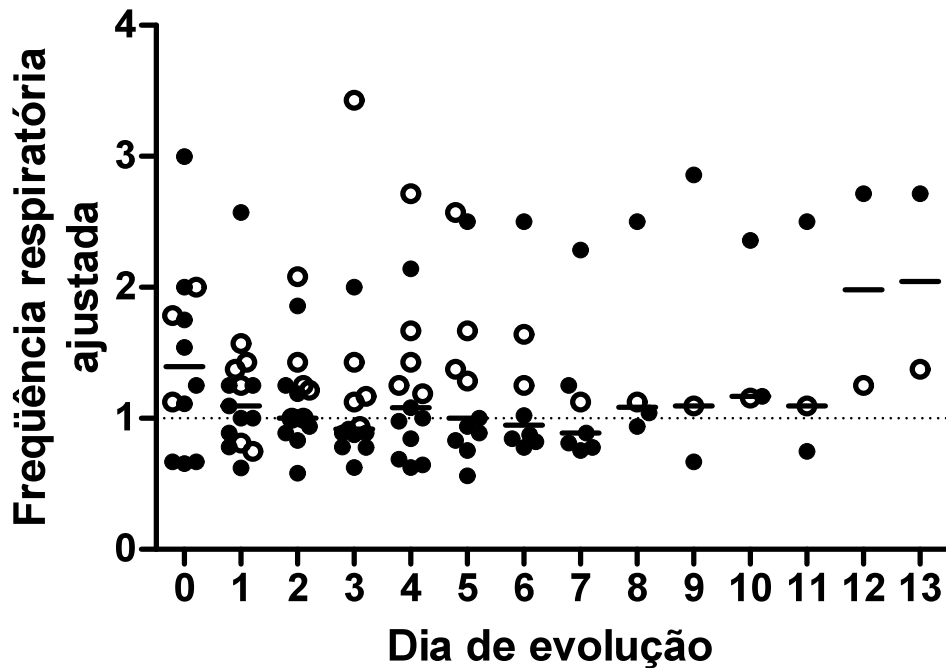


Figura 15. Frequência respiratória ajustada para a idade durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

A mediana da pressão arterial sistólica (PAS) dos pacientes no momento da internação foi de 90 mmHg (variação de 52-152 mmHg) no grupo 1 e de 91 mmHg (variação de 68-140 mmHg) no grupo 2, e não houve variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,29$ ) (Tabela 17, Figura 16). Não houve diferença significativa da PAS entre os grupos em nenhum dos dias estudados.

Tabela 17 – Valores da mediana (e variação) da pressão arterial sistólica (mmHg) durante o período de estudo.

Dia	Pressão arterial sistólica (mmHg)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	90 (52-152)	91 (68-140)	91 (52-152)
1	73 (40-122)	101 (83-131)	86 (40-131)
2	84 (35-110)	113 (87-142)	90 (35-142)
3	99 (80-118)	105 (84-157)	103 (80-157)
4	98 (80-129)	114 (102-140)	102 (80-140)
5	93 (86-106)	111 (93-123)	103 (86-123)
6	100 (82-125)	109 (66-152)	100 (66-152)
7	92 (86-109)	98	95 (86-109)
8	90 (83-121)	119	104 (83-121)
9	120 (113-127)	113	113 (113-127)
10	128 (115-141)	95	115 (95-141)
11	108 (80-137)	108	108 (80-137)
12	92	94	93 (92-94)
13	95	113	104 (95-113)

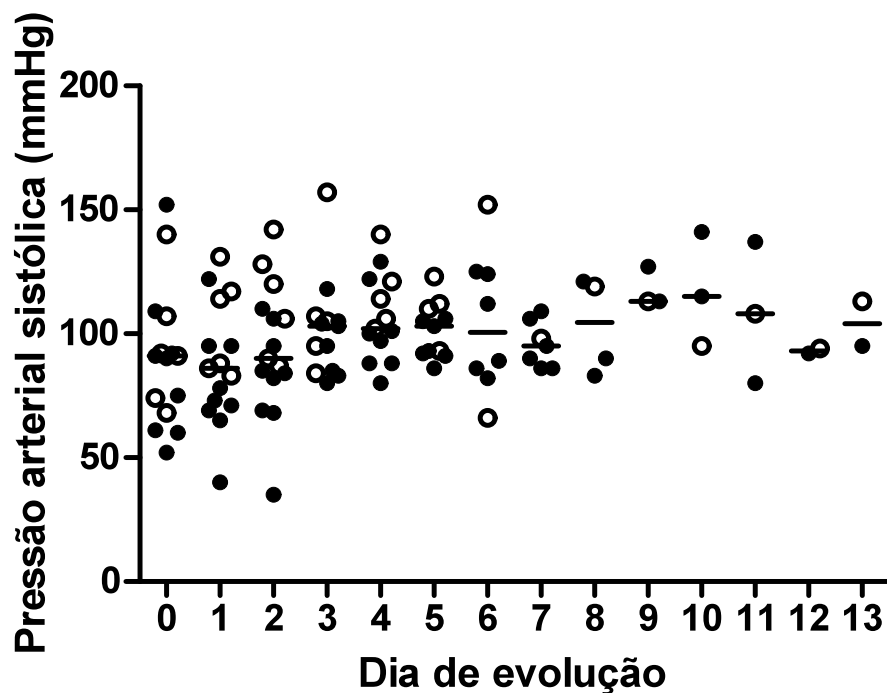


Figura 16. Pressão arterial sistólica (mmHg) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

Ajustando-se a PAS para a idade e sexo (PASa), não houve variação significativa com o tempo ( $p=0,43$ ) (Tabela 18, Figura 17). A PASa não diferiu significativamente entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados.

Tabela 18 – Valores da mediana (e variação) da pressão arterial sistólica ajustada para idade e sexo durante o período de estudo.

Dia	Pressão arterial sistólica ajustada		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	1,0 (0,5-1,7)	0,8 (0,5-1,0)	1,0 (0,5-1,7)
1	0,9 (0,4-1,4)	0,9 (0,6-1,3)	0,9 (0,4-1,4)
2	1,0 (0,4-1,7)	1,0 (0,7-1,2)	1,0 (0,4-1,7)
3	1,0 (0,9-2,1)	0,9 (0,8-1,5)	1,0 (0,8-2,1)
4	1,1 (0,9-1,7)	1,1 (0,9-1,3)	1,1 (0,9-1,7)
5	1,0 (0,9-2,0)	1,0 (0,8-1,2)	1,0 (0,8-2,0)
6	1,1 (0,9-2,2)	1,0 (0,7-1,2)	1,1 (0,7-2,2)
7	1,0 (0,8-1,9)	1,1	1,0 (0,8-1,9)
8	1,0 (0,8-1,1)	1,3	1,0 (0,8-1,3)
9	1,1 (1,0-1,2)	1,3	1,2 (1,0-1,3)
10	1,2 (1,0-1,3)	1,1	1,0 (1,0-1,3)
11	1,0 (0,7-1,3)	1,2	1,2 (0,7-1,3)
12	0,8	1,0	0,9 (0,8-1,0)
13	0,9	1,2	1,0 (0,8-1,2)

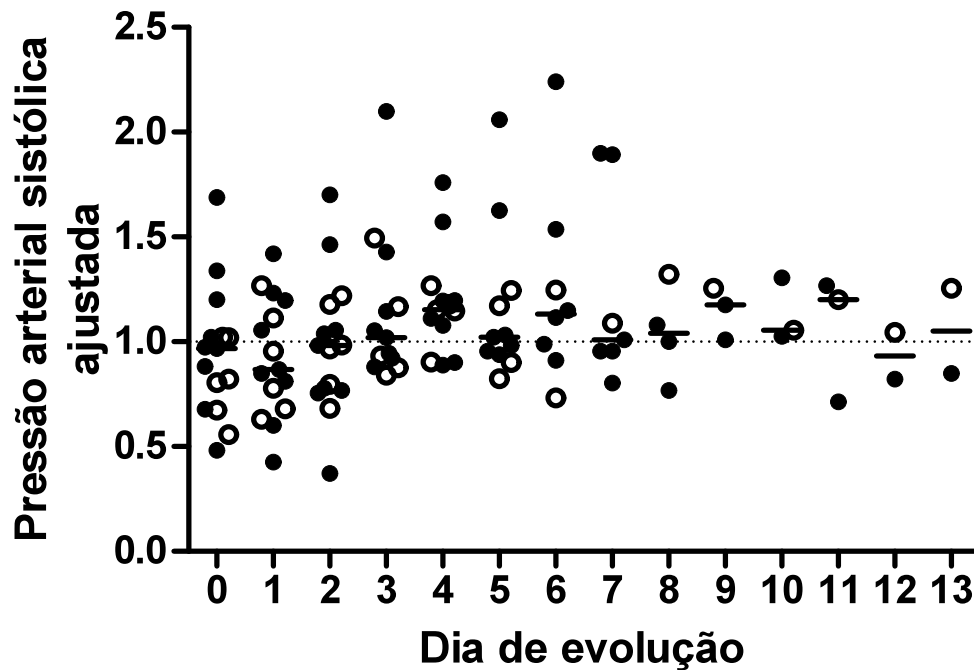


Figura 17. Pressão arterial sistólica ajustada para idade e sexo durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

A mediana da concentração do lactato arterial, no momento da internação, foi de 3,2 mmol/l (variação de 1,2-8,4 mmol/l) no grupo 1 e de 2,3 mmol/l (variação de 1,3-12,8 mmol/l) no grupo 2. A variação ao longo do tempo não foi significativa ( $p=0,91$ ) (Tabela 19, Figura 18). Os valores do lactato arterial não foram diferentes entre os pacientes dos dois grupos em nenhum dos momentos estudados.

Tabela 19 – Valores da mediana (e variação) do lactato arterial (mmol/l) durante o período de estudo.

Dia	Lactato arterial (mmol/l)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	3,2 (1,2-8,4)	2,3 (1,3-12,8)	2,8 (1,2-12,8)
1	3,1 (1,4-28,0)	1,5 (0,9-6,3)	2,0 (0,9-28,0)
2	2,5 (0,9-43,0)	1,9 (1,2-2,7)	2,2 (0,9-43,0)
3	1,8 (0,5-8,8)	2,1 (1,2-3,3)	2,1 (0,5-8,8)
4	2,0 (1,2-4,2)	2,0 (0,8-4,8)	2,0 (0,8-4,8)
5	2,7 (1,0-5,1)	2,1 (1,0-4,9)	2,6 (1,0-5,1)
6	1,8 (0,8-4,1)	8,8 (1,7-16,0)	1,8 (0,8-16,0)
7	2,3 (1,0-2,9)	4,2	2,5 (1,0-4,2)
8	1,5 (1,0-1,9)	3,5	1,9 (1,0-3,5)
9	2,3	1,8	2,0 (1,8-2,3)
10	2,4 (2,2-2,6)	2,2	2,2 (2,2-2,6)
11	2,1 (1,7-2,5)	3,3	2,4 (1,7-3,3)
12	1,7	1,9	1,8 (1,7-1,9)
13	3,2	1,2	2,2 (1,2-3,2)

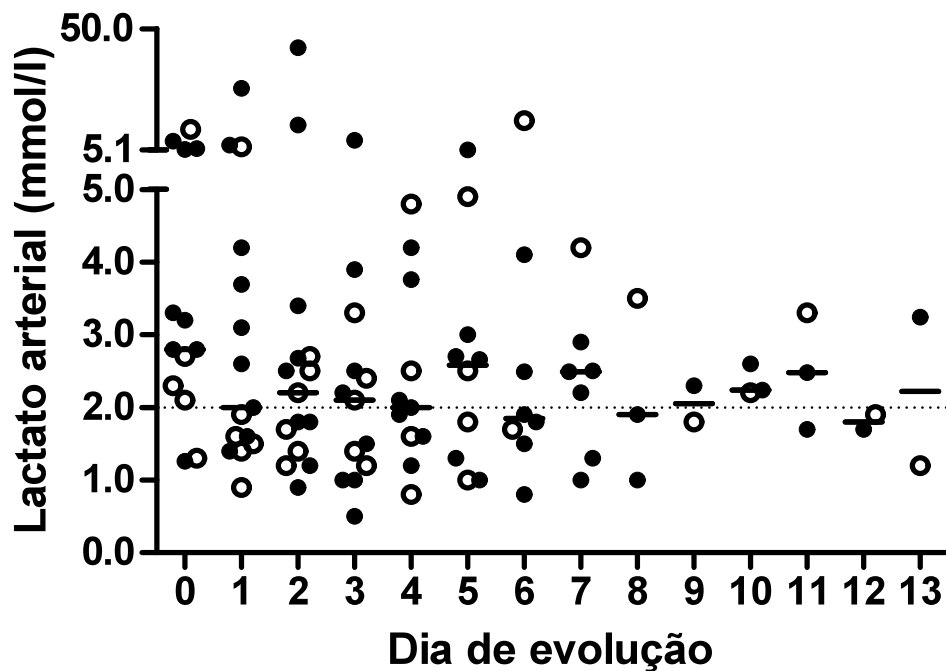


Figura 18. Concentração do lactato arterial (mmol/l) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.



A mediana do débito urinário dos pacientes no primeiro dia de evolução foi de 0,6 ml/kg/h (variação de 0,05-3,2 ml/kg/h) no grupo 1, e de 1,8 ml/kg/h (variação de 0,1-5,6 ml/kg/h) no grupo 2. Nos dias seguintes houve variação não significativa ( $p=0,94$ ) (Tabela 20, Figura 19). Não houve diferenças no débito urinário dos pacientes dos dois grupos em nenhum dos tempos estudados.

Tabela 20 – Valores da mediana (e variação) do débito urinário (ml/kg/h) durante o período de estudo.

Dia	Débito urinário (ml/kg/h)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	0,6 (0,05-3,2)	1,8 (0,1-5,6)	0,9 (0,05-5,6)
2	1,6 (0,03-2,6)	3,2 (0,07-3,8)	1,6 (0,03-3,7)
3	1,5 (0,3-4,9)	2,7 (0,1-4,5)	1,5 (0,1-4,9)
4	2,5 (0,7-6,6)	1,7 (0,04-4,0)	1,7 (0,04-6,6)
5	2,2 (0,5-5,9)	2,0 (0,06-6,5)	2,1 (0,06-6,5)
6	2,8 (0,4-3,7)	2,7 (0,08-5,2)	2,8 (0,08-5,2)
7	1,0 (0,2-4,1)	4,8	1,4 (0,2-4,7)
8	0,6 (0,5-3,8)	2,7	1,6 (0,5-3,8)
9	0,8 (0,5-1,1)	3,1	1,1 (0,5-3,1)
10	0,8 (0,5-1,1)	2,6	1,1 (0,5-2,6)
11	0,4 (0,1-0,8)	3,1	0,8 (0,1-3,1)
12	0,03	2,9	1,5 (0,03-2,9)
13	0,2	3,2	1,7 (0,2-3,2)

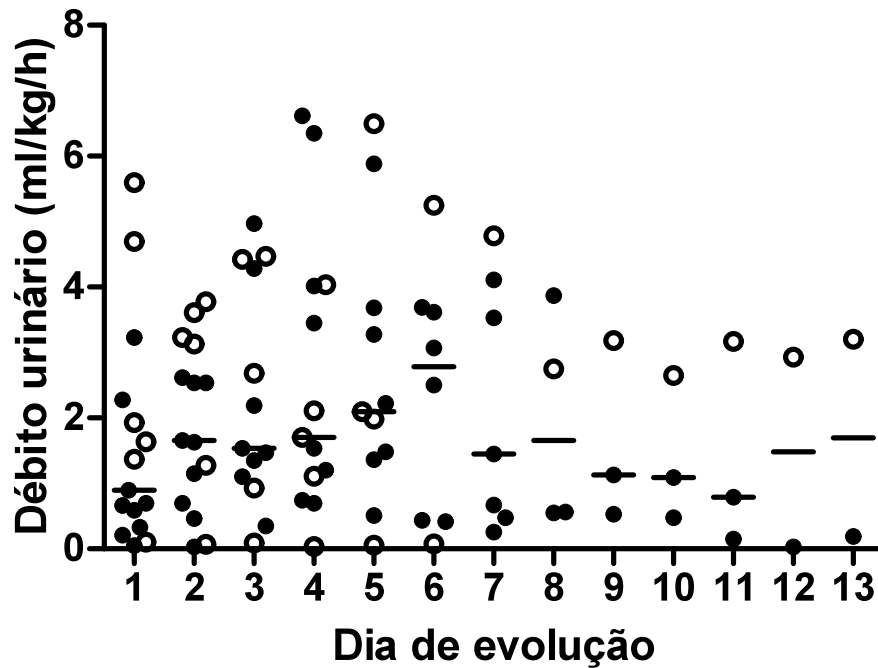


Figura 19. Débito urinário (ml/kg/h) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

Em relação à concentração sérica de creatinina, os valores medianos no dia da internação foram de 0,8 mg/dl (variação de 0,4-2,3 mg/dl) no grupo 1 e de 0,8 mg/dl (variação de 0,4-3,1 mg/dl) no grupo 2. Não houve variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,93$ ) (Tabela 21, Figura 20). Não houve diferenças entre os dois grupos nos valores da creatinina sérica em nenhum dos dias avaliados.

Tabela 21 – Valores da mediana (e variação) da concentração sérica de creatinina (mg/dl) durante o período de estudo.

Dia	Creatinina sérica (mg/dl)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	0,8 (0,4-2,3)	0,8 (0,4-3,1)	0,8 (0,4-3,1)
1	0,6 (0,4-2,8)	0,6 (0,3-3,6)	0,6 (0,3-3,6)
2	0,9 (0,4-3,5)	0,5 (0,4-5,5)	0,7 (0,4-5,5)
3	0,7 (0,4-3,5)	0,5 (0,4-4,9)	0,5 (0,4-4,9)
4	0,9 (0,4-3,7)	0,6 (0,4-4,4)	0,7 (0,4-4,4)
5	1,3 (0,4-3,4)	0,6 (0,5-5,0)	0,9 (0,4-5,0)
6	1,5 (0,4-4,0)	2,4 (0,7-4,2)	1,5 (0,4-4,2)
7	1,0 (0,4-5,0)	0,7	0,7 (0,4-5,0)
8	3,1 (0,4-4,3)	0,6	1,8 (0,4-4,3)
9	3,8 (3,3-4,4)	0,5	3,3 (0,5-4,4)
10	4,1 (3,8-4,4)	0,5	3,8 (0,5-4,4)
11	4,3 (4,2-4,4)	0,2	4,2 (0,2-4,4)
12	4,1	0,4	2,2 (0,4-4,1)
13	3,5	0,4	1,9 (0,4-3,5)

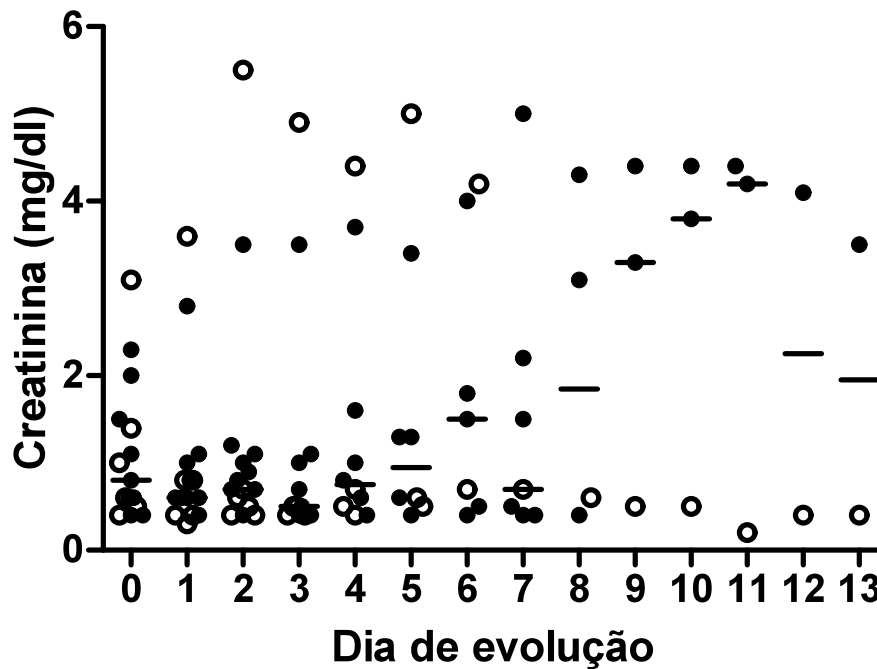


Figura 20. Concentração sérica de creatinina (mg/dl) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

#### 4.6. Marcadores inflamatórios inespecíficos

A mediana da concentração sérica da proteína C reativa no primeiro dia de internação foi de 25,0 mg/dl (variação de 6,9-28,0 mg/dl) no grupo 1 e de 20,1 mg/dl (variação de 0,6-42,5 mg/dl) no grupo 2, sem variações estatisticamente significativas ao longo do tempo ( $p=0,97$ ) (Tabela 22, Figura 21). Não houve diferença entre os valores dos dois grupos em nenhum dos dias avaliados.

Tabela 22 – Valores da mediana (e variação) da concentração sérica da proteína C reativa (mg/dl) durante o período de estudo.

Dia	Proteína C reativa (mg/dl)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	25,0 (6,9-28,0)	20,1 (0,6-42,5)	23,0 (0,6-42,5)
2	8,9 (7,6-10,3)	21,4 (6,5-56,8)	14,3 (6,5-56,8)
3	10,1 (8,2-17,0)	11,5 (0,3-22,7)	10,1 (0,3-22,7)
4	8,0 (4,0-12,0)	20,7 (19,5-21,9)	15,7 (4,0-21,9)
5	9,3	23,8 (11,8-35,8)	11,8 (9,3-35,8)
6	-	18,0 (4,0-32,1)	18,0 (4,0-32,1)
7	7,7	32,4	20,0 (7,7-32,4)
8	26,0	21,1	23,5 (21,1-26,0)
9	-	12,5	12,5
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	16,1	16,1
13	-	12,3	12,3

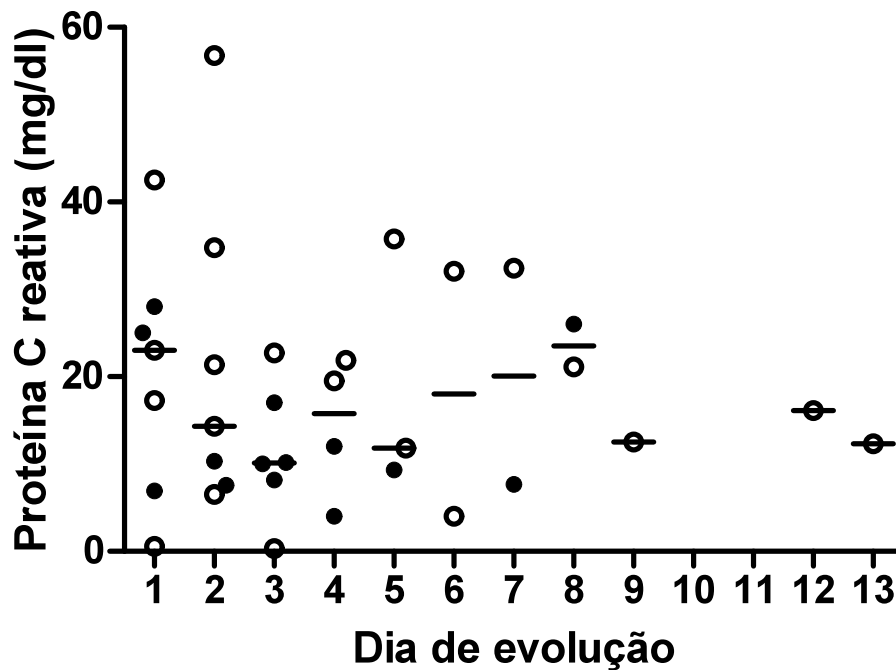


Figura 21. Proteína C reativa (mg/dl) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

Em relação à contagem de glóbulos brancos do sangue periférico, o valor da mediana no dia da internação foi de 8150 células/mm<sup>3</sup> (variação de 1400-20500 células/mm<sup>3</sup>) no grupo 1 e de 21950 células/mm<sup>3</sup> (variação de 8600-63800 células/mm<sup>3</sup>) no grupo 2. A contagem de leucócitos no dia da internação (D0) foi significativamente mais baixa no grupo 1 (p=0,03). Não houve variação significativa dos valores ao longo do tempo (p=0,62) (Tabela 23, Figura 22).

Tabela 23 – Valores da mediana (e variação) da contagem de glóbulos brancos do sangue periférico (células/mm<sup>3</sup>) durante o período de estudo.

Dia	Contagem de glóbulos brancos (células/mm <sup>3</sup> )		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	8150 (1400-20500)	21950 (8600-63800)	9150 (1400-63800)
1	17000 (3600-24500)	20100 (6200-33600)	17000 (3600-33600)
2	19050 (15300-30900)	16900 (8800-45200)	19050 (8800-45200)
3	18150 (13200-43500)	12700 (9600-37300)	17100 (9600-43500)
4	22800 (10100-36200)	12600 (6400-31300)	17800 (6400-36200)
5	22350 (11700-31800)	22600 (11000-23800)	23200 (11000-31800)
6	13700 (11000-30200)	28350 (25400-31300)	25400 (11000-31300)
7	22500 (12100-31000)	24100	22500 (11000-31000)
8	16000	29400	22700 (16000-29400)
9	25000	31500	28250 (25000-31500)
10	11400	-	11400
11	14500 (11000-18000)	31200	18000 (11000-31200)
12	19400	33200	26300 (19400-33200)
13	15000	26100	20550 (15000-26100)

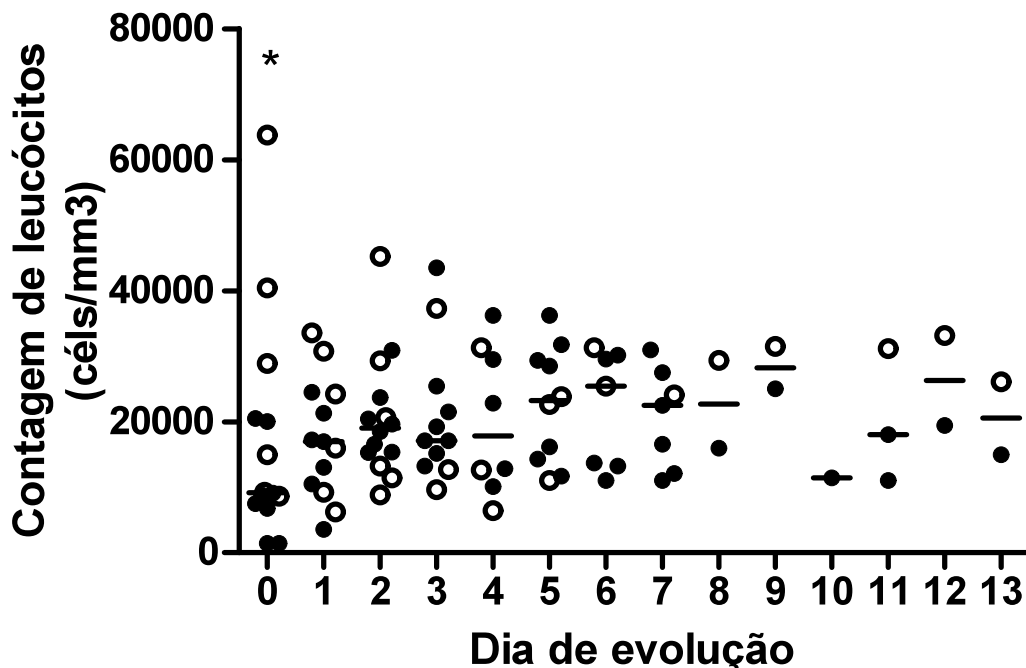


Figura 22. Contagem de glóbulos brancos do sangue periférico (células/mm<sup>3</sup>) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes. \*= diferença significativa entre os grupos.

Em relação à contagem de plaquetas, os valores da mediana no dia da internação foram de  $237 \times 10^3/\text{mm}^3$  (variação de  $10-749 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) no grupo 1 e de  $209 \times 10^3/\text{mm}^3$  (variação de  $3-267 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) no grupo 2. Não houve variação significativa ao longo do tempo ( $p=0,38$ ) (Tabela 21, Figura 20). Não houve diferença entre os valores dos dois grupos em nenhum dos dias do estudo.

Tabela 24 – Valores da mediana (e variação) da contagem de plaquetas do sangue periférico ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) durante o período de estudo.

Dia	Contagem de plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	237 (10-749)	209 (3-267)	230 (3-749)
1	220 (8-347)	110 (6-224)	148 (6-347)
2	105 (10-256)	82 (6-133)	91 (6-256)
3	75 (19-332)	57 (6-248)	70 (6-332)
4	63 (19-216)	125 (19-271)	100 (19-271)
5	128 (67-269)	183 (5-262)	128 (5-269)
6	92 (33-270)	55 (14-97)	89 (14-270)
7	172 (66-334)	10	67 (10-334)
8	76	16	46 (16-76)
9	45	18	31 (18-45)
10	56	21	38 (21-56)
11	48 (44-53)	21	44 (21-53)
12	66	18	42 (18-66)
13	101	31	66 (31-101)

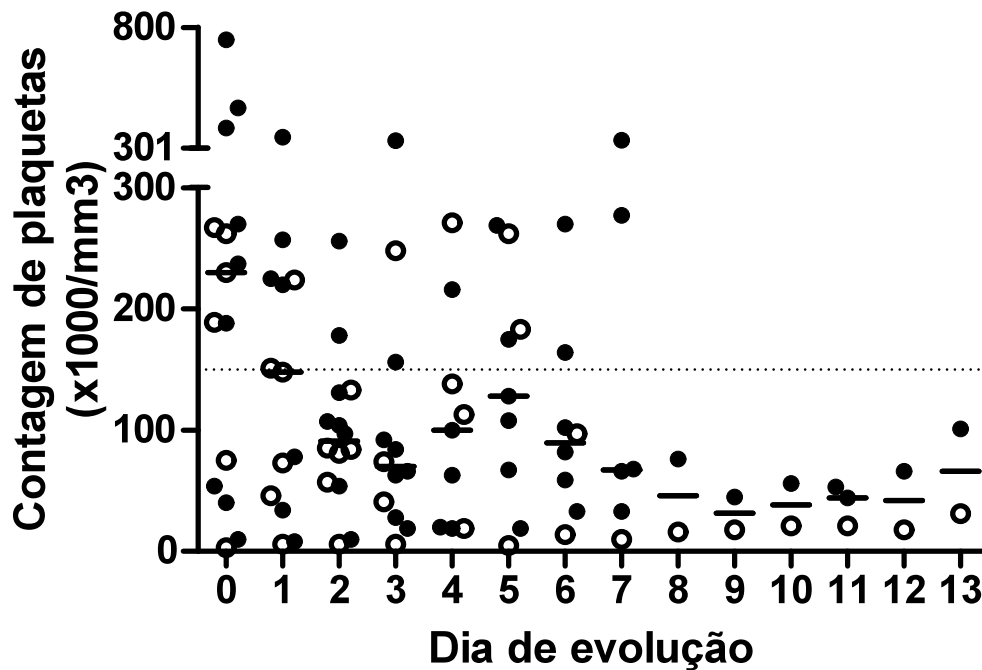


Figura 23. Contagem de plaquetas do sangue periférico ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

Quanto à temperatura, a maioria dos pacientes apresentava febre (temperatura axilar  $> 37,5$  °C) na admissão, sem variação significativa nos dias subsequentes tanto na temperatura máxima ( $p=0,42$ ) quanto na mínima ( $p=0,87$ ) (Tabela 25, Figura 24). A temperatura mínima diária foi significativamente mais elevada no grupo 2 no 4º dia ( $p=0,03$ ). A temperatura máxima diária não diferiu significativamente entre os dois grupos em nenhum dos momentos estudados.



Tabela 25 – Valores da mediana (e variação) da temperatura axilar mínima e máxima (°C) durante o período de estudo.

Dia	Temperatura mínima (°C)			Temperatura máxima (°C)		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos	Grupo 1	Grupo 2	Todos
1	35,8 (35,0-38,7)	36,1 (34,6-36,5)	35,9 (34,6-38,7)	38,3 (36,4-39,6)	38,7 (36,7-39,5)	38,4 (36,4-39,6)
2	36,0 (35,0-36,9)	35,6 (35,4-38,2)	35,8 (35,0-38,2)	38,2 (37,0-39,2)	37,9 (37,2-39,6)	38,0 (37,0-39,6)
3	36,1 (35,5-36,5)	36,2 (34,0-36,7)	36,1 (34,0-36,7)	37,4 (37,1-38,3)	37,9 (36,4-39,5)	37,8 (36,4-39,5)
4	35,2 (34,8-36,7)	36,2 (35,7-36,9)	35,9 (34,8-36,9)	37,2 (36,8-38,8)	37,8 (36,9-39,4)	37,4 (36,8-39,4)
5	36,1 (35,0-36,3)	36,1 (35,5-36,5)	36,1 (35,0-36,5)	37,6 (36,4-38,0)	37,7 (37,2-38,0)	37,6 (36,4-38,0)
6	36,2 (35,0-37,1)	36,5 (36,0-37,1)	36,2 (35,0-37,1)	37,4 (37,0-38,3)	37,4 (36,6-38,3)	37,4 (36,6-38,3)
7	36,0 (35,7-36,8)	36,2	36,0 (35,7-36,8)	37,8 (37,4-38,4)	38,0	38,0 (37,4-38,4)
8	35,6 (35,5-35,8)	36,8	35,8 (35,5-36,8)	37,5	39,1	37,5 (37,5-39,1)
9	35,2 (35,0-35,5)	37,0	35,5 (35,0-37,0)	36,9 (36,8-37,0)	38,3	37,0 (36,8-38,3)
10	35,3 (35,2-35,5)	36,5	35,5 (35,2-36,5)	36,9 (36,7-37,1)	38,3	37,1 (36,7-38,3)
11	35,6 (35,5-35,7)	36,8	35,7 (35,5-36,8)	37,2 (37,0-37,5)	38,1	37,5 (37,0-38,1)
12	36,4	36,5	36,4 (36,4-36,5)	37,6	37,8	37,7 (37,6-37,8)
13	35,1	36,1	35,6 (35,1-36,1)	37,5	38,4	37,9 (37,5-38,4)

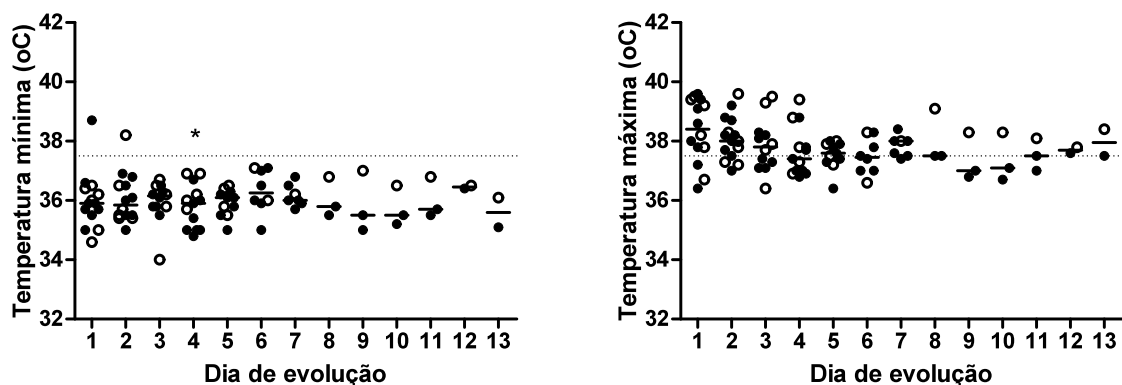


Figura 24. Variação da temperatura axilar mínima e máxima de cada dia (°C) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes. (Legenda: \*= diferença significativa entre os grupos).

#### 4.7. Evolução, complicações e desfecho

O escore PELOD mediano no dia da internação foi de 11 (variação 1-31) no grupo 1 e de 10 (variação 1-22) no grupo 2. Não houve variação significativa dos valores ao longo do tempo ( $p=0,80$ ) (Tabela 26, Figura 25). O PELOD não diferiu significativamente entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados.

Tabela 26 – Valores da mediana (e variação) do escore PELOD (*Pediatric Logistic Organ Dysfunction*) durante o período de estudo.

Dia	PELOD		
	Grupo 1	Grupo 2	Todos
0	11 (1-31)	10 (1-22)	11 (1-31)
1	12 (1-23)	2 (0-22)	12 (0-23)
2	12 (1-31)	1 (0-22)	12 (0-31)
3	6 (0-22)	1 (0-22)	1 (0-22)
4	11 (1-13)	6 (0-11)	11 (0-13)
5	2 (1-12)	6 (0-11)	2 (0-12)
6	6 (1-11)	12 (11-13)	11 (1-13)
7	6 (0-21)	2	2 (0-21)
8	11 (0-21)	11	11 (0-21)
9	11	11	11
10	11	11	11
11	16 (11-21)	2	11 (2-21)
12	21	2	11 (2-21)
13	11	2	6 (2-11)

Legenda: PELOD= *Pediatric Logistic Organ Dysfunction*

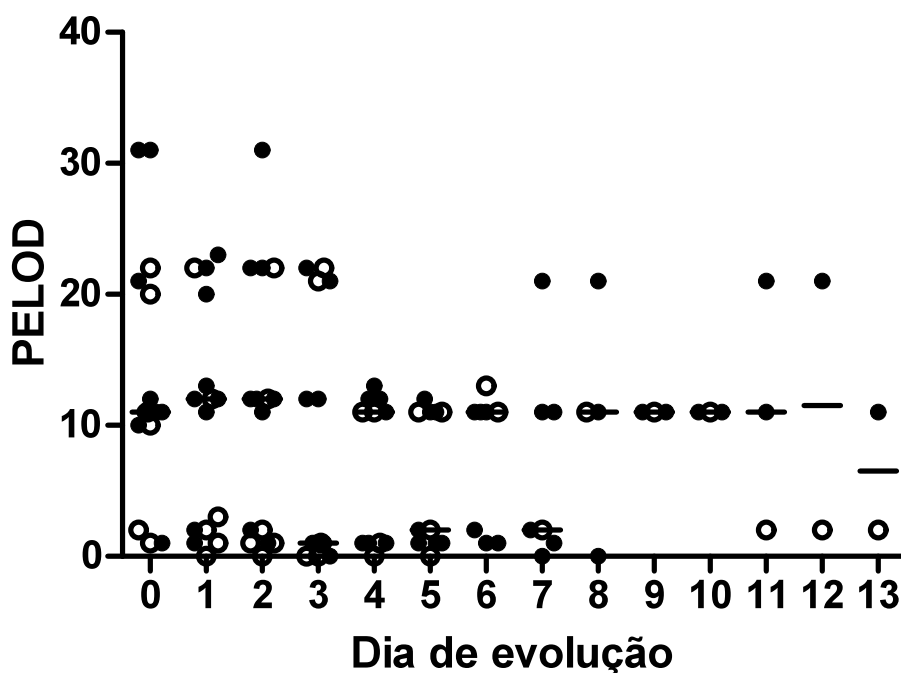


Figura 25. Escore PELOD (*Pediatric Logistic Organ Dysfunction*) durante o período de estudo.

Legenda: Círculos fechados são pacientes do grupo 1 e círculos abertos são pacientes do grupo 2. A linha central representa a mediana dos valores de todos os pacientes.

Quanto à incidência de complicações, houve 8 casos (53%) de insuficiência renal, 6 (40%) de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), 10 (67%) de insuficiência adrenal, 5 (33%) de convulsões inéditas, 2 (13%) de acidentes isquêmicos cerebrais, 10 (67%) de coagulação intravascular disseminada (CIVD) e 7 (47%) de infecção secundária. Os sítios de infecção secundária acometidos foram: pulmão (n=3), mediastino (n=1), trato digestivo (n=1), e pele e tecido subcutâneo (n=2). Outras complicações menos frequentes foram: hipertensão pulmonar com necessidade de uso de óxido nítrico (n=1), abscessos pulmonares (n=1) e necrose de mãos e pés com necessidade de amputação (n=1).

A mediana do tempo de internação na UTIP foi de 13 dias (variação de 1-84 dias). O tempo de internação hospitalar mediano foi de 28 dias (variação de 1-248 dias), sendo que dois pacientes ainda permaneciam internados até o fim do estudo. A duração mediana da

ventilação mecânica foi de 8,5 dias (variação de 1-24 dias). Apenas 3 (20%) pacientes não necessitaram de ventilação mecânica. Dois pacientes (13%) usaram óxido nítrico inalatório, um deles para hipertensão pulmonar e outro para hipoxemia refratária.

A mortalidade geral (UTIP, hospitalar e de 28 dias) foi de 33% (pacientes 2, 7, 8, 14 e 15), todos por disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. A mortalidade predita pelo PRISM variou de 0,9 a 49%, com mediana de 10,4%.

Não houve diferença, entre os grupos, na duração da internação na UTIP (grupo 1: mediana de 13 dias [variação de 1-84 dias] vs. grupo 2: mediana de 13 dias [variação de 3-33 dias];  $p=0,90$ ), duração da ventilação mecânica (grupo 1: mediana de 10 dias [variação de 1-24 dias] vs. grupo 2: mediana de 3 dias [variação de 2-14 dias];  $p=0,34$ ), duração da internação hospitalar (grupo 1: mediana de 17 dias [variação de 1-248 dias] vs. grupo 2: mediana de 29 dias [variação de 11-64 dias];  $p=0,63$ ) e número de complicações (grupo 1: mediana de 3 [variação de 1-7] vs. grupo 2: mediana de 2 [variação de 1-5];  $p=0,18$ ). A mortalidade no grupo 1 foi de 44% e no grupo 2, de 17%, porém a diferença não atingiu significância estatística ( $p=0,58$ ). Para demonstrar que uma redução na mortalidade desta magnitude seja significativa, com poder de 0,8 e significância de 0,05, seriam necessários 100 pacientes.

#### **4.8. Correlações**

Os coeficientes de correlação entre as principais variáveis clínicas, laboratoriais e ecocardiográficas, medidas no 1º dia, e suas respectivas significâncias, encontram-se detalhados na Tabela 27.

Tabela 27 – Índices de correlação (r) e significância (p) entre as variáveis clínicas, laboratoriais e ecocardiográficas no 1º dia de evolução.

		BNP	cTnI	Tmáx	PASa	FCa	Diur	Esc	Pelod	Plq	Creat	Leuc	PCR	Lact	FE	Δd%	VDF	IC	IS	NFkB
BNP	r		0.63	-0.23	0.28	0.04	-0.20	0.26	0.42	-0.40	-0.09	0.04	-0.43	0.32	0.14	0.02	0.03	0.19	0.17	-0.18
	p		0.01	0.43	0.31	0.89	0.47	0.34	0.12	0.18	0.74	0.89	0.35	0.24	0.62	0.95	0.91	0.51	0.55	0.53
cTnI	r	0.63		-0.05	0.12	-0.01	-0.38	0.23	0.37	-0.36	-0.04	0.50	-0.20	0.42	0.19	0.10	-0.08	0.19	0.16	-0.01
	p	0.01		0.86	0.66	0.98	0.16	0.42	0.17	0.23	0.89	0.08	0.66	0.12	0.49	0.72	0.77	0.49	0.57	0.98
Tmáx	r	-0.23	-0.05		0.39	0.20	-0.01	-0.13	-0.22	0.28	0.08	-0.05	-0.31	-0.11	-0.01	-0.02	-0.22	-0.02	-0.03	0.03
	p	0.43	0.86		0.17	0.49	0.98	0.67	0.45	0.38	0.79	0.89	0.54	0.72	0.96	0.95	0.45	0.96	0.93	0.92
PASa	r	0.28	0.12	0.39		-0.31	0.40	-0.24	-0.44	-0.01	-0.54	0.10	-0.71	-0.39	0.16	0.10	-0.13	0.06	0.16	-0.26
	p	0.31	0.66	0.17		0.25	0.14	0.39	0.10	0.99	0.04	0.75	0.07	0.15	0.56	0.71	0.65	0.83	0.56	0.35
FCa	r	0.04	-0.01	0.20	-0.31		-0.42	0.58	0.53	0.36	0.64	0.26	0.21	0.63	-0.45	-0.41	-0.31	0.01	-0.19	0.01
	p	0.89	0.98	0.49	0.25		0.12	0.02	0.04	0.22	0.01	0.39	0.64	0.01	0.10	0.12	0.25	0.96	0.51	0.96
Diur	r	-0.20	-0.38	-0.01	0.40	-0.42		-0.34	-0.62	0.12	-0.49	-0.09	0.04	-0.67	0.37	0.34	0.12	0.00	0.10	0.31
	p	0.47	0.16	0.98	0.14	0.12		0.22	0.01	0.71	0.06	0.76	0.94	0.01	0.18	0.21	0.67	1.00	0.71	0.27
Esc	r	0.26	0.23	-0.13	-0.24	0.58	-0.34		0.65	0.38	0.64	0.48	0.52	0.64	-0.15	-0.20	-0.17	0.21	0.03	0.06
	p	0.34	0.42	0.67	0.39	0.02	0.22		0.01	0.20	0.01	0.10	0.23	0.01	0.60	0.47	0.55	0.45	0.93	0.83
Pelod	r	0.42	0.37	-0.22	-0.44	0.53	-0.62	0.65		0.31	0.54	-0.02	0.88	0.75	-0.40	-0.47	-0.31	-0.17	-0.35	-0.30
	p	0.12	0.17	0.45	0.10	0.04	0.01	0.01		0.31	0.04	0.94	0.01	0.00	0.13	0.08	0.26	0.56	0.21	0.27
Plq	r	-0.40	-0.36	0.28	-0.01	0.36	0.12	0.38	0.31		0.35	-0.02	0.89	0.07	-0.43	-0.42	-0.69	-0.57	-0.69	-0.18
	p	0.18	0.23	0.38	0.99	0.22	0.71	0.20	0.31		0.25	0.94	0.02	0.83	0.14	0.15	0.01	0.04	0.01	0.55
Creat	r	-0.09	-0.04	0.08	-0.54	0.64	-0.49	0.64	0.54	0.35		0.19	0.36	0.74	-0.40	-0.40	-0.11	-0.14	-0.34	-0.04
	p	0.74	0.89	0.79	0.04	0.01	0.06	0.01	0.04	0.25		0.54	0.43	0.00	0.14	0.14	0.70	0.61	0.22	0.89
Leuc	r	0.04	0.50	-0.05	0.10	0.26	-0.09	0.48	-0.02	-0.02	0.19		0.37	0.34	0.33	0.31	-0.10	0.45	0.36	0.30
	p	0.89	0.08	0.89	0.75	0.39	0.76	0.10	0.94	0.94	0.54		0.47	0.25	0.27	0.31	0.75	0.13	0.23	0.32
PCR	r	-0.43	-0.20	-0.31	-0.71	0.21	0.04	0.52	0.88	0.89	0.36	0.37		0.44	-0.36	-0.50	-0.29	-0.21	-0.36	0.36
	p	0.35	0.66	0.54	0.07	0.64	0.94	0.23	0.01	0.02	0.43	0.47		0.33	0.43	0.25	0.53	0.64	0.43	0.43

(continua)

(continuação)																			
Lact	r	0.32	0.42	-0.11	-0.39	0.63	-0.67	0.64	0.75	0.07	0.74	0.34	0.44	-0.48	-0.53	-0.09	0.06	-0.18	-0.17
	p	0.24	0.12	0.72	0.15	0.01	0.01	0.01	0.00	0.83	0.00	0.25	0.33	0.07	0.04	0.75	0.84	0.51	0.54
FE	r	0.14	0.19	-0.01	0.16	-0.45	0.37	-0.15	-0.40	-0.43	-0.40	0.33	-0.36	-0.48					0.28
	p	0.62	0.49	0.96	0.56	0.10	0.18	0.60	0.13	0.14	0.14	0.27	0.43	0.07					0.31
$\Delta d\%$	r	0.02	0.10	-0.02	0.10	-0.41	0.34	-0.20	-0.47	-0.42	-0.40	0.31	-0.50	-0.53					0.29
	p	0.95	0.72	0.95	0.71	0.12	0.21	0.47	0.08	0.15	0.14	0.31	0.25	0.04					0.29
VDF	r	0.03	-0.08	-0.22	-0.13	-0.31	0.12	-0.17	-0.31	-0.69	-0.11	-0.10	-0.29	-0.09					0.55
	p	0.91	0.77	0.45	0.65	0.25	0.67	0.55	0.26	0.01	0.70	0.75	0.53	0.75					0.03
IC	r	0.19	0.19	-0.02	0.06	0.01	0.00	0.21	-0.17	-0.57	-0.14	0.45	-0.21	0.06					0.35
	p	0.51	0.49	0.96	0.83	0.96	1.00	0.45	0.56	0.04	0.61	0.13	0.64	0.84					0.20
IS	r	0.17	0.16	-0.03	0.16	-0.19	0.10	0.03	-0.35	-0.69	-0.34	0.36	-0.36	-0.18					0.42
	p	0.55	0.57	0.93	0.56	0.51	0.71	0.93	0.21	0.01	0.22	0.23	0.43	0.51					0.12
NFkB	r	-0.18	-0.01	0.03	-0.26	0.01	0.31	0.06	-0.30	-0.18	-0.04	0.30	0.36	-0.17	0.28	0.29	0.55	0.35	0.42
	p	0.53	0.98	0.92	0.35	0.96	0.27	0.83	0.27	0.55	0.89	0.32	0.43	0.54	0.31	0.29	0.03	0.20	0.12

Legenda: r = coeficiente de correlação; p = significância; BNP = peptídeo natriurético tipo B; cTnI = troponina I cardíaca; Tmáx = temperatura axilar máxima diária; PASa = pressão arterial sistólica ajustada; FCa = frequência cardíaca ajustada; Diur = débito urinário; Esc = escore inotrópico; Pelod = escore PELOD; Plq = contagem de plaquetas; Creat = creatinina sérica; Leuc = contagem de leucócitos; PCR = proteína C reativa; Lact = lactato arterial; FE = fração de ejeção;  $\Delta d\%$  = fração de encurtamento ou delta-D; VDF = volume diastólico final do ventrículo esquerdo; IC = índice cardíaco; IS = índice sistólico; NF- $\kappa$ B = ativação do fator nuclear kappa B.

\* Os números com fundo cinza representam significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Todos os gráficos destas e das demais correlações encontram-se nos Apêndices 8.5 e 8.6.

### **Variáveis clínicas e laboratoriais gerais**

A PASa correlacionou-se negativamente com a creatinina sérica.

A FCa correlacionou-se positivamente com o escore inotrópico, o PELOD, a creatinina sérica, e o lactato arterial

A concentração do lactato arterial apresentou correlação positiva com a FCa, o escore inotrópico, o PELOD, e a creatinina sérica e negativa com o débito urinário e a  $\Delta d\%$ .

O escore inotrópico apresentou correlação positiva com a FCa, o PELOD, a creatinina sérica e o lactato arterial.

O PELOD foi correlacionado positivamente à FCa, ao escore inotrópico, ao lactato arterial, à creatinina sérica, e à PCR, e negativamente ao débito urinário.

O débito urinário apresentou correlação negativa com o PELOD e o lactato arterial

A contagem de plaquetas correlacionou-se positivamente à concentração de PCR, e negativamente ao VDFVEa, ao IC e ao IS.

A concentração sérica de creatinina correlacionou-se positivamente à FCa, ao escore inotrópico, ao PELOD, e ao lactato arterial, e negativamente à PASa.

A PCR correlacionou-se positivamente com o PELOD e a contagem de plaquetas.

### **Parâmetros laboratoriais do estudo (BNP, cTnI e NF- $\kappa$ B)**

A ativação do NF- $\kappa$ B, estimada pela expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ , correlacionou-se positivamente apenas com o VDFVEa.

As concentrações plasmáticas do BNP e da cTnI correlacionaram-se positivamente entre si, mas não com outras variáveis clínicas ou ecocardiográficas.

### Parâmetros ecocardiográficos

A  $\Delta d\%$  correlacionou-se negativamente com o lactato arterial.

O VDFVEa correlacionou-se positivamente com expressão relativa do gene do I- $\kappa B\alpha$ , e negativamente com a contagem de plaquetas.

O IS correlacionou-se positivamente com a expressão relativa do gene do I- $\kappa B\alpha$ , e negativamente com a contagem de plaquetas.

O IC apresentou correlação negativa com a contagem de plaquetas.

## 4.9. Estudo da associação entre inflamação e disfunção miocárdica

Os pacientes foram divididos arbitrariamente, de acordo com a expressão relativa do gene do I- $\kappa B\alpha$  em dois grupos: abaixo da mediana ( $< 6,8$ ) e acima ou igual à mediana ( $\geq 6,8$ ). Verificamos que o grupo de pacientes com expressão relativa do gene do I- $\kappa B\alpha$  acima da mediana apresentava maior número de valores de FE  $\geq 50\%$  ( $p=0,007$ ) (Tabela 28, Figura 26).

Tabela 28 – Distribuição dos pacientes de acordo com a fração de ejeção (acima ou abaixo de 50%) e a expressão relativa do gene do I- $\kappa B\alpha$  (abaixo ou acima da mediana).

	Expressão do I- $\kappa B\alpha$ (unidades arbitrárias)		Total
	$\geq 6,8$	$< 6,8$	
FE $< 50\%$	2	7	9
FE $\geq 50\%$	6	0	6
Total	8	7	$p=0,007$



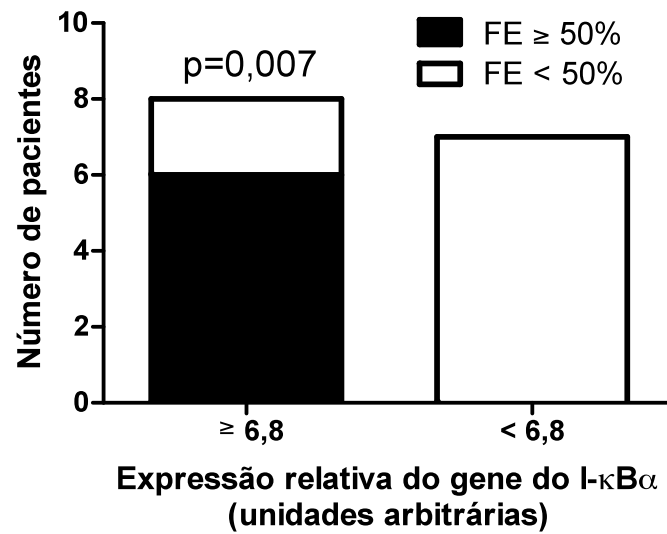


Figura 26. Distribuição dos pacientes de acordo com a expressão relativa do gene do I-κBα e a fração de ejeção.

Legenda: Barras brancas são pacientes com fração de ejeção  $< 50\%$  e barras pretas são pacientes com FE  $\geq 50\%$ .

As figuras abaixo apresentam a evolução temporal da FE e da expressão do gene do I-κBα em cada paciente estudado.

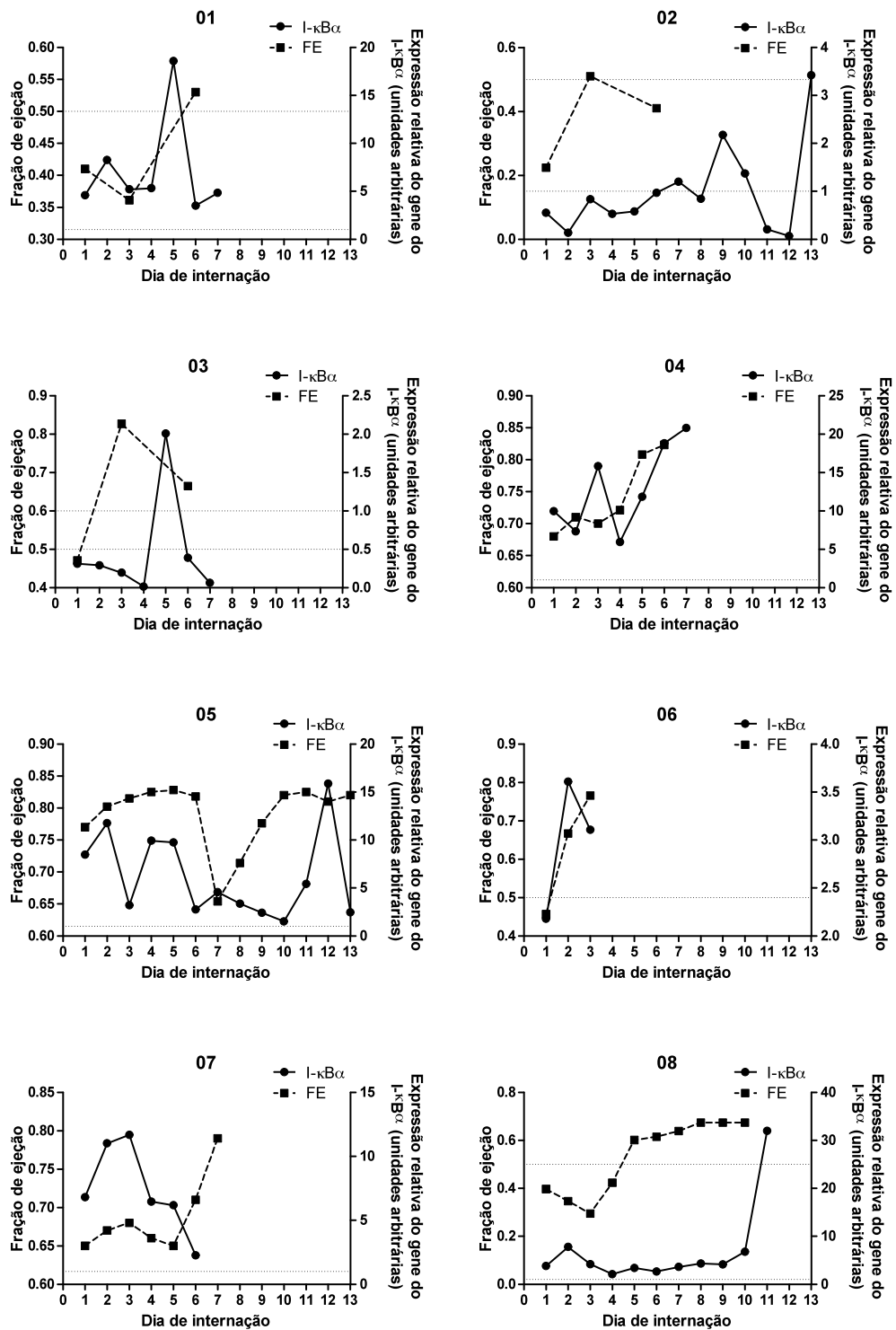


Figura 27. Evolução temporal da fração de ejeção (FE) e da expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  nos pacientes 01 a 08.

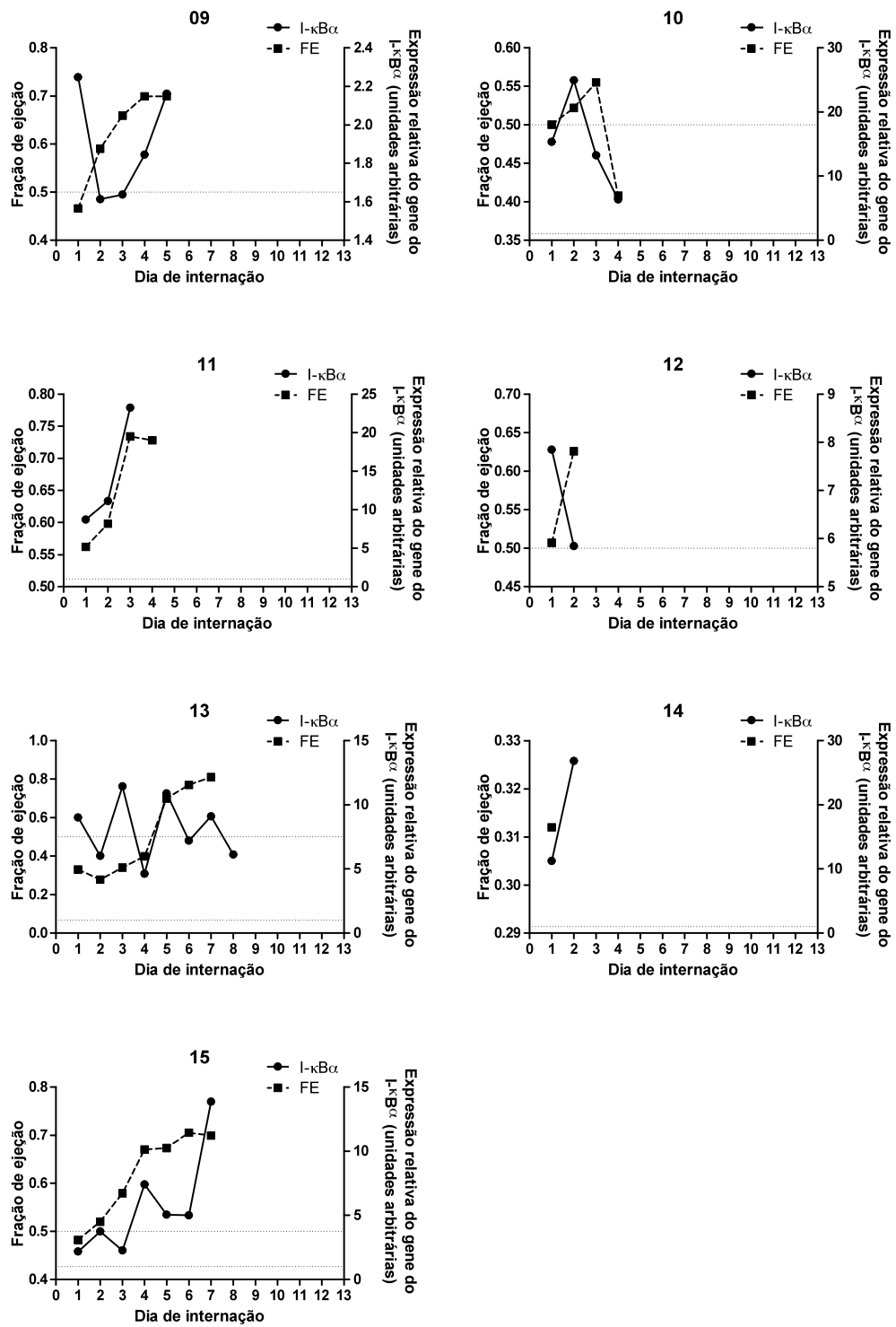


Figura 28. Evolução temporal da fração de ejeção (FE) e da expressão relativa do gene do I-κBα nos pacientes 09 a 15.

#### **4.10. Estudo de variáveis confundidoras**

##### **Imunodeficiência**

Em nosso estudo, os pacientes portadores da síndrome de Down (pacientes 5 e 7), cuja imunidade pode ser deficiente (LOCKITCH et al., 1987), tiveram expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  bastante elevada, de maneira semelhante aos pacientes não-portadores da síndrome, com picos de 15,9 e 11,7, respectivamente. Um dos pacientes apresentava imunodeficiência celular (paciente 1). Sua expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  foi bastante elevada, em níveis semelhantes aos dos demais pacientes, com pico de 18,6.

##### **Uso de corticosteróides**

Em nosso estudo, apenas dois (13%) pacientes não fizeram uso de corticosteróides durante o período em que foram avaliados. Os demais pacientes utilizaram hidrocortisona em doses de estresse para insuficiência adrenal, conforme protocolos (CARLOTTI, 2005), e dois deles utilizaram dexametasona, nas doses de 0,5 mg/kg de 12 em 12 horas por 24 horas a partir do 4º dia (paciente 10) ou 0,15 mg/kg de 6 em 6 horas por 48 horas a partir do dia de internação (paciente 12). A análise da expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  desses pacientes no dia anterior, no dia do início do corticóide e no dia seguinte ao início do uso não mostrou efeito significativo da administração dessas drogas ( $p=0,85$ , Figura 29).

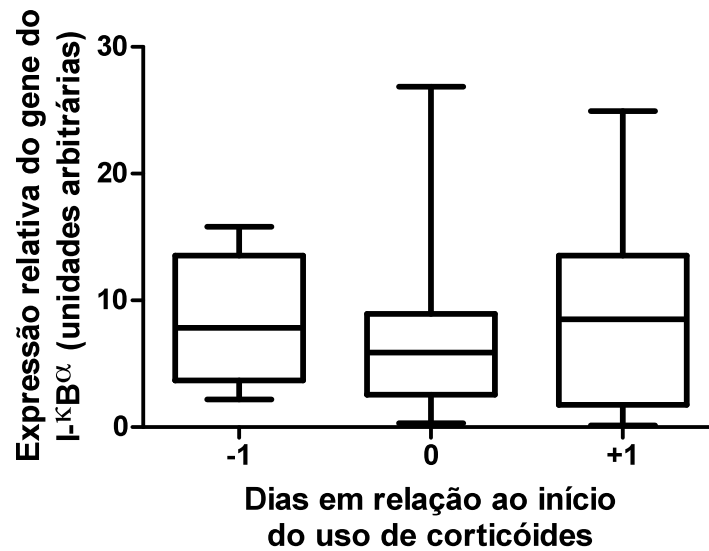


Figura 29. Expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  no dia anterior (-1), no dia do início do uso de corticóides (0) e no dia seguinte ao uso (+1).

Legenda: A linha central representa a mediana, as caixas, o intervalo interquartil, e as barras, a variação total.

No primeiro dia de internação, cinco pacientes (33%) já estavam em uso de corticóides, enquanto dez pacientes não estavam. Não houve diferença na expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  entre esses dois grupos de pacientes ( $p=0,51$ , Figura 30). Além disso, excluindo-se os pacientes que usaram corticóides no 1º dia, a expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  no 1º dia continuou sendo significativamente menor nos pacientes com FE < 50% (grupo 1) ( $p<0,05$ , Figura 31).

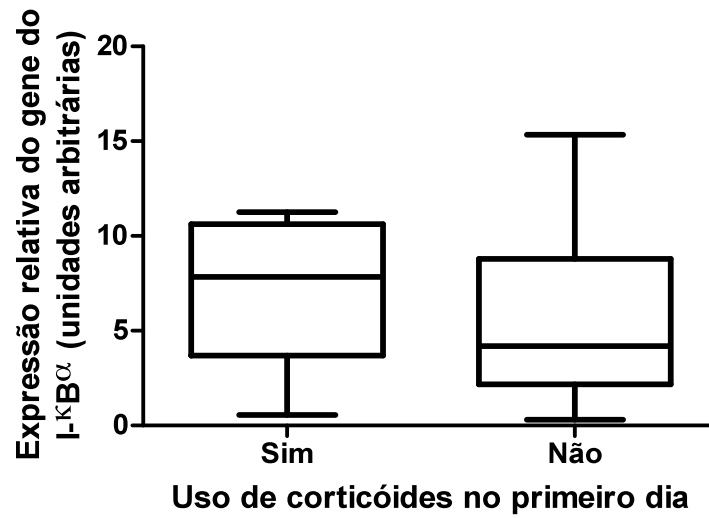


Figura 30. Expressão relativa do gene do I-κBα no 1º dia, em pacientes que receberam ou não corticóides no primeiro dia de internação.

Legenda: A linha central representa a mediana, as caixas, o intervalo interquartil, e as barras, a variação total.

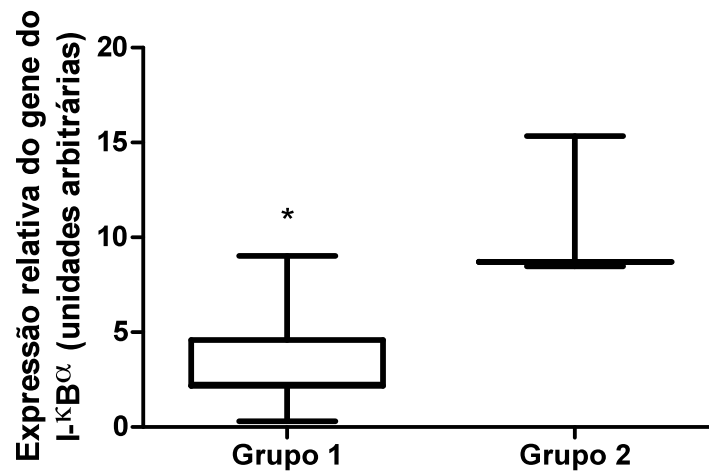


Figura 31. Expressão relativa do gene do I-κBα somente nos pacientes que não receberam corticóides no primeiro dia de internação, nos grupos 1 e 2.

Legenda: A linha central representa a mediana, as caixas, o intervalo interquartil, e as barras, a variação total.

Legenda: \*= diferença significativa entre os grupos.

## **5. Discussão**

Este trabalho mostra pela primeira vez a relação entre a intensidade da SRIS, avaliada pela ativação do NF- $\kappa$ B, com o grau de disfunção miocárdica e a evolução clínica e laboratorial de pacientes pediátricos com choque séptico.

### **5.1. Caracterização da população**

Nossa população foi constituída de crianças internadas na UTIP de um hospital terciário, com PRISM mediano alto, correspondendo a uma mortalidade mediana prevista de 10,4%. Em relação ao gênero, houve ligeira predominância de pacientes do sexo masculino. De fato, relata-se predomínio de meninos em populações pediátricas com choque séptico (CARCILLO et al., 1991; DE OLIVEIRA et al., 2008; MATSUMOTO et al., 1997). Os pacientes apresentaram grande variação da idade (2,5 meses até 17 anos) e também do peso (2 a 113 kg). Por um lado, esses dados mostram a grande diversidade de indivíduos atendidos no âmbito da terapia intensiva pediátrica. Por outro lado, essa grande variabilidade entre os indivíduos pode dificultar a interpretação dos resultados obtidos, por causa de variações fisiológicas na resposta a infecções graves características de cada faixa etária.

Ao observarmos a distribuição dos diagnósticos (Tabela 1), podemos notar o predomínio das infecções respiratórias (6 pacientes, ou 46%) como evento desencadeante da sepse. Esse número é compatível com dados disponíveis na literatura médica mostrando que, nos EUA, as infecções respiratórias respondem por 37% das causas de sepse e choque séptico em crianças (BOCHUD et al., 2004; MATSUMOTO et al., 1997). Em outro trabalho, as

infecções respiratórias foram responsáveis por mais de 50% dos casos de sepse grave e choque séptico (DE OLIVEIRA et al., 2008). O sítio de infecções secundárias, em nosso estudo, seguiu distribuição semelhante. Além disso, notamos grande incidência de *Staphylococcus aureus* como agente etiológico isolado em culturas. Este dado também está de conformidade com o que vem sendo descrito nos trabalhos sobre a epidemiologia da sepse. De acordo com esses trabalhos recentes de revisão, as bactérias Gram-positivas vêm adquirindo importância crescente na etiologia da sepse em indivíduos de todas as idades, com destaque para *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase-negativos, enterococos e estreptococos (BOCHUD et al., 2004; CARCILLO et al., 1991; HAN et al., 2003; TABBUTT, 2001).

Também pudemos observar a alta prevalência de doenças crônicas, ou comorbidades, tais como: doenças crônicas do SNC, miopatias, síndrome de Down, estados pós-operatórios, entre outros. Já foi demonstrado que essa população de crianças é mais susceptível ao desenvolvimento de infecções graves (MATSUMOTO et al., 1997), e estudos anteriores já relataram a alta prevalência destas condições em pacientes que desenvolvem sepse grave ou choque séptico (CARCILLO et al., 1991; DE OLIVEIRA et al., 2008; HAN et al., 2003).

Todos os pacientes desenvolveram disfunção cardiovascular clinicamente diagnosticada. Entretanto, somente 9 deles (60%) apresentaram a FE < 50% no primeiro dia.

## **5.2. Dados clínicos e laboratoriais gerais**

As informações obtidas das variáveis clínicas são compatíveis com o diagnóstico de disfunção cardiovascular grave realizado pela equipe médica, no dia da admissão na UTIP, e reforçam a confiabilidade dos dados coletados. Nossos pacientes encontravam-se, no momento da internação, taquicárdicos (FCa > 1), taquipnéicos (FRa > 1), hipotensos (PASa <



1), e com lactato arterial elevado ( $> 2$  mmol/l). Entretanto, não houve diferenças nos valores da maioria das variáveis clínicas e laboratoriais gerais entre os grupos de estudo. Isso pode refletir a adequação do tratamento, objetivando a normalização dos parâmetros vitais e laboratoriais.

### **5.3. Terapia cardiovascular**

Nossos pacientes receberam, no primeiro dia de internação, um volume mediano de fluidos de 92 ml/kg (variação 38-274 ml/kg), incluindo volume de expansões, transfusões, medicações, soro de manutenção e bombas pressóricas. Recomenda-se que pacientes com choque séptico recebam em média de 40-60 ml/kg de fluidos na primeira hora, podendo atingir até 120 ml/kg nas primeiras 6 horas (CARCILLO et al., 1991; CARCILLO; FIELDS, 2002), desde que não haja sinais de sobrecarga volêmica cardiopulmonar. Consideramos, assim, que a terapêutica foi realizada pela equipe médica de acordo com as recomendações atuais (CARCILLO; FIELDS, 2002). O escore inotrópico mediano apresentou ampla faixa de valores nos dois grupos, refletindo que o estado hemodinâmico dos pacientes foi bastante variável. Esse dado é confirmado pela ampla variação da medida do IC. Apesar de não ter havido diferença significativa entre o escore inotrópico dos dois grupos, seus valores correlacionaram-se positivamente com a FCa e o lactato arterial, que constituem marcadores do estado hemodinâmico e da adequação do tratamento, e com o PELOD e a creatinina sérica, que são marcadores de disfunções orgânicas.

#### **5.4. Evolução e complicações**

A incidência e a natureza das complicações orgânicas encontradas em nosso trabalho foram bastante similares às descritas em estudos prévios. Oliveira et al relatam, em uma coorte de 102 crianças com sepse grave e choque séptico, alta incidência de disfunção renal, pulmonar, hematológica e neurológica (DE OLIVEIRA et al., 2008). De fato, o PELOD, em nosso estudo, correlacionou-se positivamente com a FCa, o escore inotrópico, a creatinina sérica, a PCR e o lactato arterial e negativamente com o débito urinário.

A duração da internação na UTIP teve grande variação em nossos pacientes, fato este compatível com a grande heterogeneidade dos casos, cujo escore de gravidade PRISM também variou grandemente. Além disso, nossos pacientes tinham grande prevalência de comorbidades e alguns deles tiveram sérias complicações, implicando em maior tempo de internação. De fato, dois deles ainda permaneciam internados em enfermarias até o encerramento do presente estudo. Estes fatos também ajudam a entender a grande necessidade e duração do suporte ventilatório mecânico fornecido a estes pacientes, também semelhante a trabalhos previamente publicados (CARCILLO et al., 1991; DE OLIVEIRA et al., 2008; FENTON et al., 2004; HAN et al., 2003). A incidência de SDRA foi bastante semelhante à reportada previamente (CARCILLO et al., 1991; DE OLIVEIRA et al., 2008).

#### **5.5. Desfecho**

A mortalidade observada em nosso trabalho de 33% encontra-se dentro da faixa de valores relatada em outros estudos (20-80%) (CARCILLO et al., 1991; CHARPENTIER et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2008; FENTON et al., 2004; HAN et al., 2003; JARDIN et al., 1999; PARRILLO, 1993).

## 5.6. Parâmetros ecocardiográficos

Em nosso estudo, a FE mediana no 1º dia foi de 47% (variação de 22-77%), com grande melhora ao longo do tempo na maioria dos pacientes. A partir do 7º dia de evolução, nenhum paciente em nosso estudo tinha FE < 50%, dado este semelhante ao observado em adultos (PARKER et al., 1984) e crianças (FENTON et al., 2004). Entretanto, devemos considerar que muitos dos nossos pacientes ainda estavam em uso de drogas inotrópicas nesse dia. As medidas ecocardiográficas apresentaram correlação negativa com o lactato arterial e com a contagem de plaquetas. Esses resultados mostram que a medida ecocardiográfica do desempenho ventricular pode fornecer informações muito úteis a respeito do estado hemodinâmico de pacientes com choque séptico. A medida do VDFVEa apresentou redução não significativa ao longo dos dias. Não diferiu significativamente entre os grupos nem entre sobreviventes e não-sobreviventes. Estudos em adultos mostraram que pacientes com choque séptico que apresentam maior VDFVE tiveram melhor sobrevida (PARKER et al., 1984). Nossos dados não puderam demonstrar o mesmo em uma população pediátrica, mas isso pode se dever ao pequeno tamanho amostral e grande variação de faixas etárias. O IC mediano no 1º dia estava abaixo do recomendado, de 3,3 l/min/m<sup>2</sup> (BRIERLEY et al., 2008), e assim se manteve até o 2º dia. A partir do 3º dia houve manutenção em torno do valor de referência. Não houve diferença entre os grupos. Entretanto, observamos que alguns pacientes apresentaram IC muito baixo (0,8 l/min/m<sup>2</sup>) ou muito alto (8,7 l/min/m<sup>2</sup>) ao longo da evolução, mostrando a grande variação de estados hemodinâmicos que podem surgir na população pediátrica com choque séptico, conforme demonstrado previamente (CENEVIVA et al., 1998). O IS estava na maior parte dos momentos abaixo do valor mínimo de referência (30 ml/m<sup>2</sup>). Esses achados são compatíveis com o entendimento recente de que a adequação do estado hemodinâmico obrigatoriamente deve levar em consideração elementos: (a)

qualitativos, (b) quantitativos, (c) temporais e (d) relativos à homeostase. Em outras palavras, é necessário saber se dado débito cardíaco é adequado para um paciente em particular, em dado momento, em situação metabólica particular. Isso pode ser atingido fazendo-se os seguintes questionamentos: (a) a oferta de oxigênio está adequada às demandas do paciente? (b) o transporte de oxigênio está ocorrendo com pressão de perfusão adequada? (c) o paciente consegue utilizar o oxigênio transportado? e (d) qual(is) a(s) causa(s) de alteração em qualquer dos itens anteriores? (TIBBY; MURDOCH, 2003). Além de todos esses fatores, devemos considerar que os pacientes com maior comprometimento miocárdico recebem maior suporte inotrópico, o que certamente mascara o verdadeiro grau de disfunção (RUDIGER; SINGER, 2007).

## **5.7. Marcadores inflamatórios**

A concentração sérica da PCR não apresentou variação significativa ao longo do tempo. Correlacionou-se, no entanto, positivamente com o PELOD, mostrando relação com a disfunção orgânica. A contagem de leucócitos apresentou grande variação, mas foi menor nos pacientes do grupo 1 no dia da internação. A contagem de plaquetas, que também pode ser considerada um marcador da intensidade da SRIS, devido à ativação da cascata de coagulação e ao aumento do fator de ativação plaquetária, também se apresentou reduzida em diversos momentos da internação e correlacionou-se negativamente com o VDFVEa, o IC e o IS. Este achado é surpreendente, pois pacientes com maior ativação da cascata de coagulação e, conseqüentemente, com contagens mais baixas de plaquetas, tiveram melhor desempenho ecocardiográfico medido no primeiro dia. Entretanto, isso é concordante com os achados relativos à ativação do NF- $\kappa$ B, pois, ao analisarmos as correlações entre os marcadores da intensidade da SRIS e os indicadores clínicos e ecocardiográficos de disfunção miocárdica,

verificamos que a expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  correlacionou-se positivamente com o VDFVEa. Além disso, dentre os pacientes com expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  acima da mediana no 1º dia observou-se maior proporção de indivíduos com FE  $\geq$  50%. Surpreendentemente, pacientes com maior intensidade da SRIS tiveram maior VDFVEa e melhor desempenho miocárdico. Esses achados conflitam com os conhecimentos atuais de que a intensidade da reação inflamatória estaria relacionada à maior disfunção miocárdica na sepse (ver abaixo o item 5.9).

O uso de glicocorticóides pela maioria de nossos pacientes poderia, em teoria, alterar a expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ , porque um dos mecanismos de ação destas drogas é justamente o aumento da expressão desse gene (BOTTERO et al., 2003). Entretanto, nós verificamos que a expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  não sofreu alterações quando comparada no dia anterior, no dia do início e no dia seguinte ao início do uso de glicocorticóides. Também não houve diferença na expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ , no 1º dia, entre pacientes que estavam e que não estavam em uso de glicocorticóides. Além disso, a expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  continuou sendo significativamente mais elevada nos pacientes do grupo 2 mesmo excluindo da análise os pacientes que estavam usando glicocorticóides no 1º dia. Esses achados nos levam a crer que, nas doses utilizadas, não houve interferência do uso de glicocorticóides sobre a expressão relativa do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$ , e que os resultados encontrados de associação entre ativação do NF- $\kappa$ B e melhores VDFVEa e FE devem-se a outros fatores ainda não esclarecidos.

Em nossa população de estudo, havia dois pacientes portadores da síndrome de Down, cuja imunidade poderia estar comprometida (LOCKITCH et al., 1987). Um terceiro paciente foi diagnosticado, após sua inclusão no estudo, como sendo portador de imunodeficiência do tipo celular. Entretanto, estes três pacientes apresentaram expressões

relativas do gene do I- $\kappa$ B $\alpha$  bastante elevadas, de maneira semelhante aos demais pacientes, o que nos levou a crer que a presença dessas comorbidades não comprometeu nossos resultados.

## **5.8. Marcadores cardíacos**

As concentrações dos peptídeos natriuréticos têm sido recentemente utilizadas para estimar o desempenho miocárdico e para obter informações diagnósticas e prognósticas, inclusive em pacientes com sepse, com boa correlação com o índice cardíaco e a mortalidade (CASTILLO et al., 2004; CHARPENTIER et al., 2004; COWIE; MENDEZ, 2002; MCCULLOUGH; FONAROW, 2003; PHUA et al., 2005; RUDIGER; SINGER, 2007; WITTHAUT et al., 2003)

Em nossa população de estudo, o BNP estava elevado no dia da internação na maioria dos pacientes, dado este também compatível com o comprometimento hemodinâmico e concordante com os estudos publicados em adultos com sepse e choque séptico (CASTILLO et al., 2004; CHARPENTIER et al., 2004; COWIE; MENDEZ, 2002; MCCULLOUGH; FONAROW, 2003; PHUA et al., 2005; RUDIGER; SINGER, 2007; WITTHAUT et al., 2003). Na população pediátrica, o único estudo sobre peptídeos natriuréticos e sepse que pudemos identificar demonstrou que as concentrações plasmáticas de NT-proBNP estavam mais aumentadas em crianças com choque séptico do que em crianças com sepse (FRIED et al., 2006). Não houve variações temporais significativas, nem diferenças entre os grupos, nem correlação de suas concentrações com variáveis clínicas ou ecocardiográficas, contrariando o que já foi demonstrado (CASTILLO et al., 2004; COWIE; MENDEZ, 2002; MCCULLOUGH; FONAROW, 2003; PHUA et al., 2005). Entretanto, isso também pode significar que o estado hemodinâmico desses pacientes, sobretudo na faixa etária pediátrica, depende não só do desempenho miocárdico, mas também da frequência

cardíaca, da adequação da volemia e da pós-carga (GROCOTT-MASON; SHAH, 1998; TIBBY; MURDOCH, 2003). Fried et al não demonstraram diferença na concentração de NT-proBNP, em crianças com sepse, entre as que tiveram ou não disfunção sistólica (FRIED et al., 2006). Devemos levar em consideração que a concentração de BNP pode estar elevada em pacientes gravemente enfermos por fatores extra-cardíacos, como por exemplo, hipertensão pulmonar, SDRA, embolia pulmonar aguda, doença pulmonar obstrutiva crônica com *cor pulmonale*, insuficiência renal, disfunção hepática, hemorragia subaracnóide, hipertireoidismo, etc (PHUA et al., 2005). Além disso, a concentração de BNP pode estar aumentada devido à própria sepse, presença de LPS e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ ), e expansão agressiva da volemia (FRIED et al., 2006; PHUA et al., 2005; RUDIGER; SINGER, 2007). Diversos de nossos pacientes apresentaram pelo menos uma dessas condições, e isso pode também explicar a falta de correlação entre o BNP e os parâmetros ecocardiográficos. A concentração de BNP apresentou correlação positiva significativa com a concentração de cTnI no 1º dia. Este achado pode ser explicado pelo fato de que os pacientes cujo miocárdio esteja sofrendo maior sobrecarga de volume ou pressão, estejam em um estado de alto consumo miocárdico de oxigênio e, somando-se a isso, o desequilíbrio no transporte e consumo orgânico de oxigênio, esses fatores em conjunto explicariam as concentrações elevadas de cTnI.

A cTnI tem sido implicada como marcador de disfunção miocárdica em pacientes com choque séptico. Relata-se elevação de cTnI em 31 a 85% de pacientes gravemente enfermos com sepse (AMMANN et al., 2001; MEHTA et al., 2004; TURNER et al., 1999; VER ELST et al., 2000). Estudos em adultos têm demonstrado correlação de maiores concentrações de cTnI com maior mortalidade (MEHTA et al., 2004; RUDIGER; SINGER, 2007; TURNER et al., 1999), maior suporte inotrópico (RUDIGER; SINGER, 2007;

TURNER et al., 1999), e disfunção do VE (CHARPENTIER et al., 2004; FERNANDES et al., 1999; MEHTA et al., 2004; VER ELST et al., 2000).

Em nossos pacientes, houve elevação da cTnI em 4 pacientes de maneira persistente, e em 3 pacientes de maneira transitória, com incidência total de 46%, valor este bastante semelhante aos publicados em crianças. Em estudo com 23 pacientes pediátricos com choque séptico e falência cardiovascular, Fenton et al observaram concentrações elevadas de cTnI em mais de 50% dos pacientes, e a concentração de cTnI na admissão à UTIP estava relacionada à baixa FE e à gravidade da doença, mas não ao grau de suporte inotrópico utilizado. Ressalta-se, entretanto, que as mudanças observadas nas concentrações de cTnI não foram acompanhadas de mudanças nas medidas ecocardiográficas ou no grau de suporte inotrópico necessário (FENTON et al., 2004). Em nosso estudo, a cTnI não apresentou valor preditivo de morte, nem diferiu entre os grupos, mas correlacionou-se positivamente com a concentração de BNP, conforme comentado anteriormente. A ausência de correlação da cTnI com outras variáveis poderia ser devida ao fato de que elevações nas concentrações de cTnI podem ser devidas não só à isquemia miocárdica, mas também a extravasamento de cTnI pela membrana plasmática após lesão do aparato contrátil sem, no entanto, haver morte celular (RUDIGER; SINGER, 2007).

Muitos autores têm relatado uma discordância entre os achados clínicos e de necropsia de pacientes vítimas de choque séptico. Os achados histopatológicos mostram lesões teciduais mínimas, contrastando com a importante disfunção observada clinicamente, em diversos órgãos, incluindo coração, rins, fígado, pulmões, entre outros (HOTCHKISS; KARL, 2003; RUDIGER; SINGER, 2007). A esse tipo de lesão disfuncional chamou-se “*stunning*”. Este fenômeno poderia explicar porque, em nosso estudo, não observamos correlação da concentração de cTnI com medidas ecocardiográficas de desempenho cardíaco.



## 5.9. Papel da inflamação e implicações terapêuticas

O papel da ativação do NF- $\kappa$ B na disfunção miocárdica relacionada à sepse ainda está por ser completamente esclarecido (BOHRER et al., 1997; HARKEN, 2007; LIU; MALIK, 2006). Em nosso estudo, a maior ativação do NF- $\kappa$ B não apresentou correlação com a mortalidade, mas apresentou correlação positiva com maior VDFVEa, achado este significativamente associado à melhor sobrevida em adultos (PARKER et al., 1984). Além disso, o grupo de pacientes com expressão de NF- $\kappa$ B acima da mediana apresentou maior proporção de valores de FE  $\geq$  50% e, analisando os pacientes caso a caso, parece haver associação do aumento da ativação do NF- $\kappa$ B com aumentos da FE. Esses resultados sugerem que a ativação do NF- $\kappa$ B pode ser responsável pela ativação de mecanismos adaptativos do miocárdio à situação de agressão infecciosa.

Em estudos de pacientes com sepse grave e choque séptico, a ativação do NF- $\kappa$ B foi maior do que em controles saudáveis, e correlacionou-se significativamente com as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, sICAM-1, score APACHE de gravidade, entre outros (DAS, 2003; ZHANG; GHOSH, 2000) e com a gravidade da SRIS e a mortalidade (LIU; MALIK, 2006; PATERSON et al., 2000). Também há evidências de maior ativação do NF- $\kappa$ B em pacientes gravemente doentes que morrem, quando comparados com aqueles que sobrevivem (BOHRER et al., 1997; PATERSON et al., 2000). Em estudo observacional, Arnalich et al verificaram que adultos com sepse grave apresentam marcada ativação do NF- $\kappa$ B e que pacientes que morreram tiveram maior ativação do NF- $\kappa$ B (ARNALICH et al., 2000). Todavia, no mesmo estudo, não houve correlação entre a ativação do NF- $\kappa$ B e as concentrações séricas de citocinas.

Dadas as observações dos efeitos deletérios do aumento da concentração dos mediadores pró-inflamatórios sobre o desempenho miocárdico em pacientes com choque

séptico (COURT et al., 2002; GROCOTT-MASON; SHAH, 1998; KUMAR et al., 1996), e o papel central desempenhado pelo NF- $\kappa$ B na iniciação, manutenção e cessação da SRIS, seria lógico concluir que a ativação do NF- $\kappa$ B fosse diretamente proporcional ao grau de disfunção miocárdica. Entretanto, o uso de inibidores da ativação do NF- $\kappa$ B em modelos experimentais animais tem apresentado resultados conflitantes. De fato, o completo bloqueio da cascata inflamatória pode ser prejudicial. Ratos com hiperexpressão de I- $\kappa$ B $\alpha$  não desenvolveram sepse após injeção de LPS (BOHRER et al., 1997; HAUDEK et al., 2001). Em outro modelo animal, camundongos que não expressam a subunidade p50 e são heterozigóticos para a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B tiveram maior mortalidade após injeção de LPS (GADJEVA et al., 2004). A inibição farmacológica do NF- $\kappa$ B em animais tem apresentado resultados discordantes em estudos diferentes feitos pelos mesmos autores (SU et al., 2008). Além disso, há relatos de aumento na mortalidade após uso de bloqueadores do TNF- $\alpha$  em pacientes com sepse grave (HOTCHKISS; KARL, 2003). Em modelos de isquemia-reperfusão, já foi demonstrado que a administração de SN50, um potente inibidor da translocação e ativação do NF- $\kappa$ B, uma hora antes de submeter os animais à circulação extra-corpórea, resulta em melhor função cardiopulmonar, manutenção do transporte de oxigênio e menor pressão arterial pulmonar, comparados à administração de solução salina isotônica (DUFFY et al., 2009). Outros autores também têm relatado efeitos benéficos da inibição do NF- $\kappa$ B em modelos de lesão de isquemia-reperfusão (GUTIERREZ et al., 2008). Em contrapartida, já foi demonstrado que a ativação do NF- $\kappa$ B em cardiomiócitos in vitro protege as células contra apoptose induzida. Entretanto, estes resultados ainda não puderam ser comprovados in vivo (GUTIERREZ et al., 2008).

Muitos autores têm questionado qual o verdadeiro papel da hiperinflamação na evolução de pacientes com sepse grave ou choque séptico, porque as tentativas de utilização de agentes anti-inflamatórios têm mostrado resultados desapontadores (corticóides, anticorpos

monoclonais contra endotoxina, antagonistas do TNF- $\alpha$  ou do receptor solúvel de IL-1, anti-inflamatórios não-esteroidais, e inibidores do NF- $\kappa$ B) (DAS, 2003; HARKEN, 2007; HOTCHKISS; KARL, 2003; PRICE et al., 1999). Os estudos conduzidos em animais que demonstraram benefícios da inibição de citocinas ou seus receptores têm sofrido várias críticas. Uma delas é a de que esses animais receberam doses elevadas de LPS, e apresentaram elevações das concentrações de citocinas pró-inflamatórias muito acima das observadas em pacientes humanos, o que ficou conhecido como “*cytokine storm*”. Isso explicaria o fato de que esses animais foram beneficiados com o uso de anticorpos ou bloqueadores de citocinas ou seus receptores, mas esses resultados não puderam ser reproduzidos em humanos (HOTCHKISS; KARL, 2003). A outra crítica é a de que, em estudos experimentais, os indivíduos recebem o tratamento antes do insulto. Em ensaios clínicos, a administração do agente só pode ser feita após o insulto (DAS, 2003; HARKEN, 2007). Não é possível prever quando uma pessoa desenvolverá sepse e, por isso, novos estudos precisam ser desenhados para investigar se a inibição farmacológica do NF- $\kappa$ B é benéfica mesmo se realizada horas ou dias após o insulto inicial.

O controle da ativação do NF- $\kappa$ B é atualmente uma estratégia promissora para o controle da hiperinflamação em pacientes sépticos. Entretanto, como essa mesma hiperinflamação faz parte da resposta fisiológica de combate ao agente agressor, existem dúvidas acerca do grau e do momento ideal de bloqueio da ativação do NF- $\kappa$ B (GUTIERREZ et al., 2008; HARKEN, 2007). Além disso, o NF- $\kappa$ B desempenha inúmeros outros papéis, como por exemplo, na diferenciação e ativação de macrófagos, no controle da apoptose, na linfopoiese, etc (UWE, 2008). Nossos resultados sugerem um papel benéfico do NF- $\kappa$ B na ativação de mecanismos compensatórios miocárdicos à injúria infecciosa. Portanto, o ideal seria desenvolver estratégias terapêuticas visando modular, ao invés de suprimir, a atividade do NF- $\kappa$ B (FRODE-SALEH; CALIXTO, 2000; LIU; MALIK, 2006; MARIK, 2002; MERX;

WEBER, 2007). Para isso, novos estudos são necessários na investigação do papel da ativação do NF- $\kappa$ B na disfunção miocárdica de pacientes com choque séptico.

### **5.10. Limitações**

As limitações deste estudo são o pequeno tamanho amostral e a ampla variação da faixa etária.

## 6. Conclusões

O BNP e a cTnI não foram bons marcadores de disfunção cardiovascular em crianças com choque séptico. A ativação do NF- $\kappa$ B correlacionou-se com melhores índices ecocardiográficos de desempenho miocárdico, o que pode sugerir um efeito benéfico desse mecanismo na adaptação miocárdica à injúria nessa população. A mortalidade em pacientes com menor ativação do NF- $\kappa$ B foi maior, embora nosso estudo não tenha poder suficiente para alcançar significância estatística.

## 7. Referências

- American Heart Association. PALS - Pediatric Advanced Life Support - Provider Manual. Portuguese ed. Hazinski MF, editor. Buenos Aires: Waverly Hispanica S.A.; 2002.
- Ammann P, Fehr T, Minder EI, Gunter C, Bertel O. Elevation of troponin I in sepsis and septic shock. *Intensive care medicine*. 2001 Jun;27(6):965-9.
- Arnalich F, Garcia-Palomero E, Lopez J, Jimenez M, Madero R, Renart J, et al. Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun*. 2000 Apr;68(4):1942-5.
- Azzazy HM, Christenson RH. B-type natriuretic peptide: physiologic role and assay characteristics. *Heart failure reviews*. 2003 Oct;8(4):315-20.
- Bayes-Genis A, Santalo-Bel M, Zapico-Muniz E, Lopez L, Cotes C, Bellido J, et al. N-terminal probrain natriuretic peptide (NT-proBNP) in the emergency diagnosis and in-hospital monitoring of patients with dyspnoea and ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail*. 2004 Mar 15;6(3):301-8.
- Bochud PY, Bonten M, Marchetti O, Calandra T. Antimicrobial therapy for patients with severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Critical care medicine*. 2004 Nov;32(11 Suppl):S495-512.
- Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Mannel D, et al. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1;100(5):972-85.
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997 Jul;112(1):235-43.

- Bottero V, Imbert V, Frelin C, Formento JL, Peyron JF. Monitoring NF-kappa B transactivation potential via real-time PCR quantification of I kappa B-alpha gene expression. *Mol Diagn.* 2003;7(3-4):187-94.
- Brierley J, Choong K, Cornell T, Decaen A, Deymann A, Doctor A, et al. 2007 American College of Critical Care Medicine clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal septic shock\*. *Critical care medicine.* 2008 Nov 28.
- Brown JM. Use of echocardiography for hemodynamic monitoring. *Critical care medicine.* 2002 Jun;30(6):1361-4.
- Carcillo JA, Davis AL, Zaritsky A. Role of early fluid resuscitation in pediatric septic shock. *JAMA.* 1991 Sep 4;266(9):1242-5.
- Carcillo JA, Fields AI. Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal patients in septic shock. *Critical care medicine.* 2002 Jun;30(6):1365-78.
- Carlotti APCP. *Manual de Rotinas de Terapia Intensiva Pediátrica.* First ed. São Paulo: Tecmedd; 2005.
- Carmona F, Manso PH, Vicente WV, Castro M, Carlotti AP. Risk stratification in neonates and infants submitted to cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a multimarker approach combining inflammatory mediators, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and troponin I. *Cytokine.* 2008 Jun;42(3):317-24.
- Castillo JR, Zagler A, Carrillo-Jimenez R, Hennekens CH. Brain natriuretic peptide: a potential marker for mortality in septic shock. *Int J Infect Dis.* 2004 Sep;8(5):271-4.
- Ceneviva G, Paschall JA, Maffei F, Carcillo JA. Hemodynamic support in fluid-refractory pediatric septic shock. *Pediatrics.* 1998 Aug;102(2):e19.
- Charpentier J, Luyt CE, Fulla Y, Vinsonneau C, Cariou A, Grabar S, et al. Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. *Critical care medicine.* 2004 Mar;32(3):660-5.

- Court O, Kumar A, Parrillo JE. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care*. 2002 Dec;6(6):500-8.
- Cowie MR, Mendez GF. BNP and congestive heart failure. *Progress in cardiovascular diseases*. 2002 Jan-Feb;44(4):293-321.
- Das UN. Current advances in sepsis and septic shock with particular emphasis on the role of insulin. *Med Sci Monit*. 2003 Aug;9(8):RA181-92.
- de Oliveira CF, de Oliveira DS, Gottschald AF, Moura JD, Costa GA, Ventura AC, et al. ACCM/PALS haemodynamic support guidelines for paediatric septic shock: an outcomes comparison with and without monitoring central venous oxygen saturation. *Intensive care medicine*. 2008 Jun;34(6):1065-75.
- Duffy JY, McLean KM, Lyons JM, Czaikowski AJ, Wagner CJ, Pearl JM. Modulation of nuclear factor-kappaB improves cardiac dysfunction associated with cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest\*. *Critical care medicine*. 2009 Dec 26.
- Fenton KE, Sable CA, Bell MJ, Patel KM, Berger JT. Increases in serum levels of troponin I are associated with cardiac dysfunction and disease severity in pediatric patients with septic shock. *Pediatr Crit Care Med*. 2004 Nov;5(6):533-8.
- Fernandes CJ, Jr., Akamine N, Knobel E. Cardiac troponin: a new serum marker of myocardial injury in sepsis. *Intensive care medicine*. 1999 Oct;25(10):1165-8.
- Fonarow GC, Horwich TB. Combining natriuretic peptides and necrosis markers in determining prognosis in heart failure. *Reviews in cardiovascular medicine*. 2003;4 Suppl 4:S20-8.
- Fried I, Bar-Oz B, Algur N, Fried E, Gavri S, Yatsiv I, et al. Comparison of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in critically ill children with sepsis versus acute left ventricular dysfunction. *Pediatrics*. 2006 Oct;118(4):e1165-8.



- Frode-Saleh TS, Calixto JB. Synergistic antiinflammatory effect of NF-kappaB inhibitors and steroidal or non steroidal antiinflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice. *Inflamm Res*. 2000 Jul;49(7):330-7.
- Gadjeva M, Tomczak MF, Zhang M, Wang YY, Dull K, Rogers AB, et al. A role for NF-kappa B subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol*. 2004 Nov 1;173(9):5786-93.
- Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005 Jan;6(1):2-8.
- Grocott-Mason RM, Shah AM. Cardiac dysfunction in sepsis: new theories and clinical implications. *Intensive care medicine*. 1998 Apr;24(4):286-95.
- Gutierrez SH, Kuri MR, del Castillo ER. Cardiac role of the transcription factor NF-kappaB. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2008 Jun;8(2):153-60.
- Han YY, Carcillo JA, Dragotta MA, Bills DM, Watson RS, Westerman ME, et al. Early reversal of pediatric-neonatal septic shock by community physicians is associated with improved outcome. *Pediatrics*. 2003 Oct;112(4):793-9.
- Harken AH. The world of inhibitory kappaB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Nov;293(5):H2624-5.
- Haudek SB, Spencer E, Bryant DD, White DJ, Maass D, Horton JW, et al. Overexpression of cardiac I-kappaBalpha prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Mar;280(3):H962-8.
- Horwich TB, Patel J, MacLellan WR, Fonarow GC. Cardiac troponin I is associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure. *Circulation*. 2003 Aug 19;108(7):833-8.

- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003 Jan 9;348(2):138-50.
- Jardin F, Fourme T, Page B, Loubieres Y, Vieillard-Baron A, Beauchet A, et al. Persistent preload defect in severe sepsis despite fluid loading: A longitudinal echocardiographic study in patients with septic shock. *Chest*. 1999 Nov;116(5):1354-9.
- Kaplan S. Biochemical markers of myocardial injury in children. *Circulation*. 1997 Oct 21;96(8):2496-7.
- Koulouri S, Acherman RJ, Wong PC, Chan LS, Lewis AB. Utility of B-type natriuretic peptide in differentiating congestive heart failure from lung disease in pediatric patients with respiratory distress. *Pediatric cardiology*. 2004 Jul-Aug;25(4):341-6.
- Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):949-58.
- Leteurtre S, Martinot A, Duhamel A, Proulx F, Grandbastien B, Cotting J, et al. Validation of the paediatric logistic organ dysfunction (PELOD) score: prospective, observational, multicentre study. *Lancet*. 2003 Jul 19;362(9379):192-7.
- Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Apr;290(4):L622-L45.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Lockitch G, Singh VK, Puterman ML, Godolphin WJ, Sheps S, Tingle AJ, et al. Age-related changes in humoral and cell-mediated immunity in Down syndrome children living at home. *Pediatr Res*. 1987 Nov;22(5):536-40.

- Marik PE. Nuclear factor-kappaB inhibition in sepsis: steroids versus specific nuclear factor-kappaB inhibitors? *Critical care medicine*. 2002 Oct;30(10):2393-4.
- Matsumoto T, Carvalho WB, Hirschheimer MR. *Terapia Intensiva Pediátrica*. 2a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 1997.
- McCullough PA, Fonarow GC. B-type natriuretic peptide and multimarker approaches in cardiovascular medicine. *Reviews in cardiovascular medicine*. 2003;4:S1-2.
- McCullough PA, Kuncheria J, Mathur VS. Diagnostic and therapeutic utility of B-type natriuretic peptide in patients with renal insufficiency and decompensated heart failure. *Reviews in cardiovascular medicine*. 2004 Winter;5(1):16-25.
- Mehta NJ, Khan IA, Gupta V, Jani K, Gowda RM, Smith PR. Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction and adverse outcome in septic shock. *International journal of cardiology*. 2004 May;95(1):13-7.
- Merx MW, Weber C. Sepsis and the heart. *Circulation*. 2007 Aug 14;116(7):793-802.
- Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007 Mar 15;356(11):1140-51.
- Oh JK, Seward JB, Tajik AJ. *The Echo Manual*. 1a ed. Londres: Little, Brown and Company; 1994.
- Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Annals of internal medicine*. 1984 Apr;100(4):483-90.
- Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med*. 1993 May 20;328(20):1471-7.
- Paterson RL, Galley HF, Dhillon JK, Webster NR. Increased nuclear factor kappa B activation in critically ill patients who die. *Critical care medicine*. 2000 Apr;28(4):1047-51.

- Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, Stephens AC, Boldrick JC, Oragui EE, et al. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet*. 2004 Jan 17;363(9404):203-9.
- Phua J, Lim TK, Lee KH. B-type natriuretic peptide: issues for the intensivist and pulmonologist. *Critical care medicine*. 2005 Sep;33(9):2094-13.
- Pollack MM, Ruttimann UE, Getson PR. Pediatric risk of mortality (PRISM) score. *Critical care medicine*. 1988 Nov;16(11):1110-6.
- Price S, Anning PB, Mitchell JA, Evans TW. Myocardial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic implications. *Eur Heart J*. 1999 May;20(10):715-24.
- Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Critical care medicine*. 2007 Jun;35(6):1599-608.
- Schwartz SM, Duffy JY, Pearl JM, Nelson DP. Cellular and molecular aspects of myocardial dysfunction. *Critical care medicine*. 2001 Oct;29(10 Suppl):S214-9.
- Senftleben U, Karin M. The IKK/NF-kappa B pathway. *Critical care medicine*. 2002 Jan;30(1 Suppl):S18-26.
- Spies C, Haude V, Fitzner R, Schroder K, Overbeck M, Runkel N, et al. Serum cardiac troponin T as a prognostic marker in early sepsis. *Chest*. 1998 Apr;113(4):1055-63.
- Su J, Li X, Cui X, Li Y, Fitz Y, Hsu L, et al. Ethyl pyruvate decreased early nuclear factor-kappaB levels but worsened survival in lipopolysaccharide-challenged mice. *Critical care medicine*. 2008 Apr;36(4):1059-67.
- Tabbutt S. Heart failure in pediatric septic shock: utilizing inotropic support. *Critical care medicine*. 2001 Oct;29(10 Suppl):S231-6.
- Thiru Y, Pathan N, Bignall S, Habibi P, Levin M. A myocardial cytotoxic process is involved in the cardiac dysfunction of meningococcal septic shock. *Critical care medicine*. 2000 Aug;28(8):2979-83.

- Tibby SM, Murdoch IA. Monitoring cardiac function in intensive care. *Arch Dis Child*. 2003 Jan;88(1):46-52.
- Turner A, Tsamitros M, Bellomo R. Myocardial cell injury in septic shock. *Critical care medicine*. 1999 Sep;27(9):1775-80.
- Uwe S. Anti-inflammatory interventions of NF-kappaB signaling: potential applications and risks. *Biochem Pharmacol*. 2008 Apr 15;75(8):1567-79.
- van Leeuwen HJ, van der Bruggen T, van Asbeck BS, Boereboom FT. Effect of corticosteroids on nuclear factor-kappaB activation and hemodynamics in late septic shock. *Critical care medicine*. 2001 May;29(5):1074-7.
- ver Elst KM, Spapen HD, Nguyen DN, Garbar C, Huyghens LP, Gorus FK. Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock. *Clinical chemistry*. 2000 May;46(5):650-7.
- Wernovsky G, Wypij D, Jonas RA, Mayer JE, Jr., Hanley FL, Hickey PR, et al. Postoperative course and hemodynamic profile after the arterial switch operation in neonates and infants. A comparison of low-flow cardiopulmonary bypass and circulatory arrest. *Circulation*. 1995 Oct 15;92(8):2226-35.
- Witthaut R, Busch C, Fraunberger P, Walli A, Seidel D, Pilz G, et al. Plasma atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are increased in septic shock: impact of interleukin-6 and sepsis-associated left ventricular dysfunction. *Intensive care medicine*. 2003 Oct;29(10):1696-702.
- Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*. 2000;6(6):453-7.

## 8. Apêndices

### 8.1. Ficha de coleta de dados

#### DADOS PESSOAIS

Paciente n°		Registro	
Iniciais		Data de nascimento	/ /
Sexo	<input type="checkbox"/> masculino <input type="checkbox"/> feminino	Etnia	<input type="checkbox"/> branco <input type="checkbox"/> negro <input type="checkbox"/> pardo <input type="checkbox"/> amarelo
Data da admissão	/ /	Hora da admissão	: h
Peso	g	Comprimento	cm
Superfície corporal	m <sup>2</sup>	Outros:	
Diagnóstico(s)			
PRISM:			
Sítio da infecção	<input type="checkbox"/> pulmão <input type="checkbox"/> trato urinário <input type="checkbox"/> SNC <input type="checkbox"/> t. digestivo <input type="checkbox"/> outro:		
Etiologia	<input type="checkbox"/> bacteriana <input type="checkbox"/> viral <input type="checkbox"/> fúngica		
Culturas			
Antibióticos			

#### COMPLICAÇÕES

<input type="checkbox"/> Insuficiência renal	<input type="checkbox"/> SDRA
<input type="checkbox"/> Insuficiência adrenal	<input type="checkbox"/> Convulsões
<input type="checkbox"/> Infarto / hemorragia cerebral	<input type="checkbox"/> CIVD
<input type="checkbox"/> Infecção secundária (especificar sítio e etiologia):	
<input type="checkbox"/> Outros:	

#### DESFECHO

Desfecho	<input type="checkbox"/> alta <input type="checkbox"/> óbito	Data da 1ª extubação	/ /
Alta da UTI em	/ /		
Alta para casa em	/ /		
Óbito em	/ /		

## EVOLUÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL (1/2)

	Data	/	/	/	/	/	/	/
Campo	Dia de evolução	0	1	2	3	4	5	6
1	Dopamina ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )							
2	Dobutamina ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )							
3	Adrenalina ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )							
4	Noradrenalina ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )							
5	Milrinone ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )							
6	Nitroprussiato ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )							
7	Vasopressina ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )							
8	NOi (ppm)							
9	Volume recebido (ml)							
10	Diurese (ml)							
11	FC (bpm)							
12	FR (irpm)							
13	PA sistólica (mmHg)							
14	PVC (mmHg)							
15	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	/	/	/	/	/	/	/
16	Lactato (mmol/l)							
17	PCR							
18	Leucócitos (cél/mm <sup>3</sup> )							
19	SaO <sub>2</sub> /SvO <sub>2</sub> (%)	/	/	/	/	/	/	/
20	Escore PELOD							
21	Escore PRISM							
22	FE VE (Simpson, em %)							
23	FE VE (cubo, em %)							
24	$\Delta d\%$							
25	VDF VE (cm <sup>3</sup> )							
26	Infecção secundária ou piora (X)							
27	Troca de antibióticos (X)							
28	Uso de corticóide (droga e dose)							
29	Temperatura mínima e máxima	/	/	/	/	/	/	/

Instruções: Nos campos 1-8 e 11-21 colocar a dose usada ou valor medido às 08 horas do dia (ou na internação no D0); nos campos 9-10 colocar o total de 24 horas; nos campos 22-25 colocar os valores medidos pelo ecocardiograma do dia. Nos campos 26 e 27, marque com X se houve infecção secundária ou piora clínica (choque, piora da necessidade de drogas vasoativas, etc, relacionado a infecção secundária) e troca dos antibióticos. Os espaços em cinza não precisam ser preenchidos. Legenda: NOi = óxido nítrico inalatório; FC = frequência cardíaca; FR = frequência respiratória; PA = pressão arterial; PVC = pressão venosa central; PaO<sub>2</sub> = pressão arterial de oxigênio; FiO<sub>2</sub> = fração inspirada de oxigênio; PCR = proteína C reativa; SaO<sub>2</sub> = saturação arterial de oxigênio; SvO<sub>2</sub> = saturação venosa central de oxigênio; PELOD = Paediatric Logistic Organ Dysfunction; PRISM = Pediatric Risk of Mortality; FE VE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo;  $\Delta d$  = fração de encurtamento; VDF VE = volume diastólico final do ventrículo esquerdo.

## EVOLUÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL (2/2)

	Data	/	/	/	/	/	/	/
Campo	Dia de evolução	7	8	9	10	11	12	13
1	Dopamina ( $\mu\text{g/kg/min}$ )							
2	Dobutamina ( $\mu\text{g/kg/min}$ )							
3	Adrenalina ( $\mu\text{g/kg/min}$ )							
4	Noradrenalina ( $\mu\text{g/kg/min}$ )							
5	Milrinone ( $\mu\text{g/kg/min}$ )							
6	Nitroprussiato ( $\mu\text{g/kg/min}$ )							
7	Vasopressina ( $\mu\text{g/kg/min}$ )							
8	NOi (ppm)							
9	Volume recebido (ml)							
10	Diurese (ml)							
11	FC (bpm)							
12	FR (irpm)							
13	PA sistólica (mmHg)							
14	PVC (mmHg)							
15	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	/	/	/	/	/	/	/
16	Lactato (mmol/l)							
17	PCR							
18	Leucócitos (cél/mm <sup>3</sup> )							
19	SaO <sub>2</sub> /SvO <sub>2</sub> (%)	/	/	/	/	/	/	/
20	Escore PELOD							
21	Escore PRISM							
22	FE VE (Teicholz, em %)							
23	FE VE (cubo, em %)							
24	$\Delta d\%$							
25	VDFVE (cm <sup>3</sup> )							
26	Infecção secundária ou piora (X)							
27	Troca de antibióticos (X)							
28	Uso de corticóide (droga e dose)							
29	Temperatura mínima e máxima	/	/	/	/	/	/	/

Instruções: Nos campos 1-8 e 11-21 colocar a dose usada ou valor medido às 08 horas do dia (ou na internação no D0); nos campos 9-10 colocar o total de 24 horas; nos campos 22-25 colocar os valores medidos pelo ecocardiograma do dia. Nos campos 26 e 27, marque com X se houve infecção secundária ou piora clínica (choque, piora da necessidade de drogas vasoativas, etc, relacionado a infecção secundária) e troca dos antibióticos. Os espaços em cinza não precisam ser preenchidos. Legenda: NOi = óxido nítrico inalatório; FC = frequência cardíaca; FR = frequência respiratória; PA = pressão arterial; PVC = pressão venosa central; PaO<sub>2</sub> = pressão arterial de oxigênio; FiO<sub>2</sub> = fração inspirada de oxigênio; PCR = proteína C reativa; SaO<sub>2</sub> = saturação arterial de oxigênio; SvO<sub>2</sub> = saturação venosa central de oxigênio; PELOD = *Paediatric Logistic Organ Dysfunction*; PRISM = *Pediatric Risk of Mortality*; FE VE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo;  $\Delta d\%$  = fração de encurtamento; VDFVE = volume diastólico final do ventrículo esquerdo.



## 8.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Senhores pais ou responsáveis: seu filho está sendo convidado a participar do estudo *“Avaliação das concentrações plasmáticas de peptídeo natriurético tipo B e troponina I cardíaca e da ativação do fator nuclear kappa-B em neutrófilos e células mononucleares do sangue periférico e sua correlação com a gravidade e duração da disfunção miocárdica em crianças com choque séptico”*.

Em casos como o de seu filho, a presença de uma infecção muito grave pode levar ao quadro que chamamos de choque séptico. Nessa situação, diversos órgãos apresentam dificuldade de funcionar corretamente, e entre eles o coração é um dos mais importantes. Quando o coração não funciona direito, a pressão do sangue fica baixa e o sangue circula com dificuldade, prejudicando ainda mais o paciente. Por isso é muito importante que os médicos tenham condições de saber rapidamente, e o quanto antes, se o coração dessas crianças está ou não funcionando direito, para poderem tratar adequadamente com os medicamentos corretos para cada caso. Este estudo pretende encontrar maneiras mais práticas, rápidas e baratas de fazer isso. É por isso que a participação de seu filho é tão importante.

Este estudo não prejudicará em nenhum momento o tratamento de seu filho, nem serão testados novos medicamentos nele. Somente serão colhidas pequenas quantidades de sangue a mais do que normalmente já é feito, diariamente, durante 7 dias. Esse sangue será colhido pelos tubos que já estarão instalados nas veias do paciente, por isso não serão feitas “picadas” a mais.

Caso os senhores concordem em autorizar a participação de seu filho no estudo, poderão mudar de idéia e desistir a qualquer momento, sem que o tratamento dele seja prejudicado de forma alguma, bastando para isso informar os médicos responsáveis.

Não serão feitos pagamentos nem indenizações de qualquer espécie. A participação no estudo é estritamente voluntária. Todas as dúvidas serão esclarecidas pelos médicos responsáveis pelo estudo, pessoalmente ou por telefone. O responsável pela pesquisa é o Dr. Fabio Carmona, que pode ser encontrado no telefone (16) 3602-2577 todos os dias, pela manhã.

**Autorização:**

Eu, \_\_\_\_\_, autorizo voluntariamente a participação de meu filho \_\_\_\_\_ no estudo acima, e tive todas as minhas dúvidas respondidas e esclarecidas.

\_\_\_\_\_ (local e data)

\_\_\_\_\_ (responsável)

\_\_\_\_\_ (pesquisador)

\_\_\_\_\_ (testemunha)

### 8.3. Resultados da avaliação da qualidade do RNA por eletroforese

A maioria das amostras estudadas exibiu as duas bandas clássicas do RNA (ex: 11-1, 11-3, 8-10). Em algumas amostras, pode-se observar degradação do RNA (ex: 5-11, 13-7), porém ainda exibindo as duas bandas do RNA. Poucas amostras tiveram degradação completa do RNA (ex: 7-3, 7-5). As amostras com degradação do RNA foram submetidas a nova extração e, persistindo a degradação, foi utilizada a segunda alíquota armazenada no Trizol®. Também houve amostras com contaminação por DNA (ex: 2-8, 2-9), que precisaram receber tratamento com DNase. A qualidade de algumas das amostras pode ser vista nas figuras abaixo, de maneira ilustrativa.

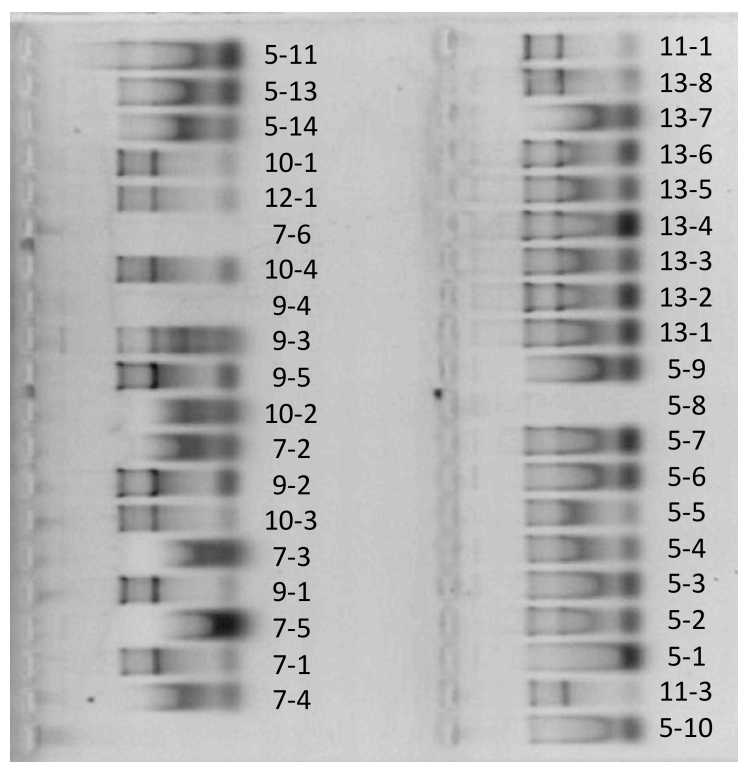


Figura 32. Primeira eletroforese para determinação da qualidade do RNA contido nas amostras.

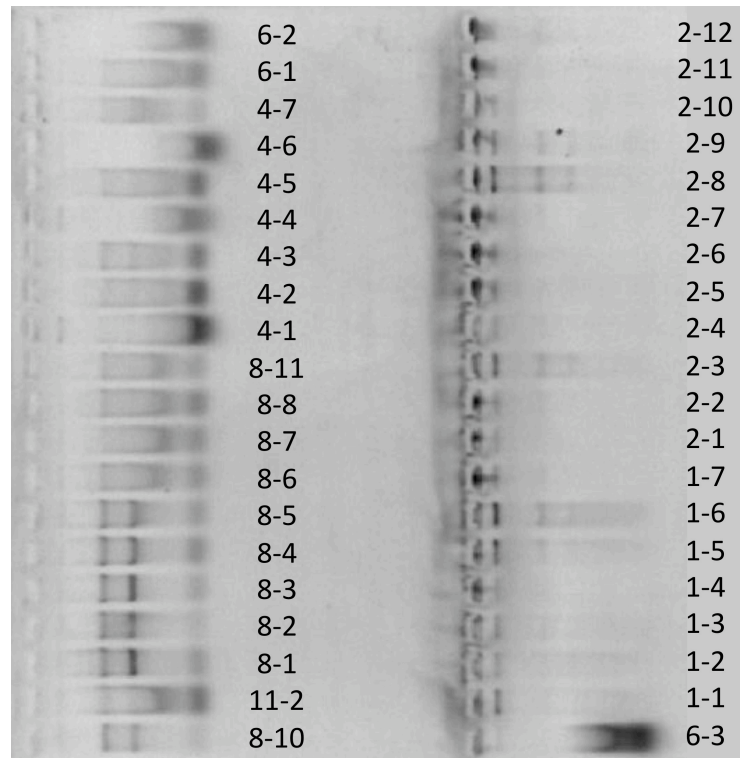


Figura 33. Segunda eletroforese para determinação da qualidade do RNA contido nas amostras.

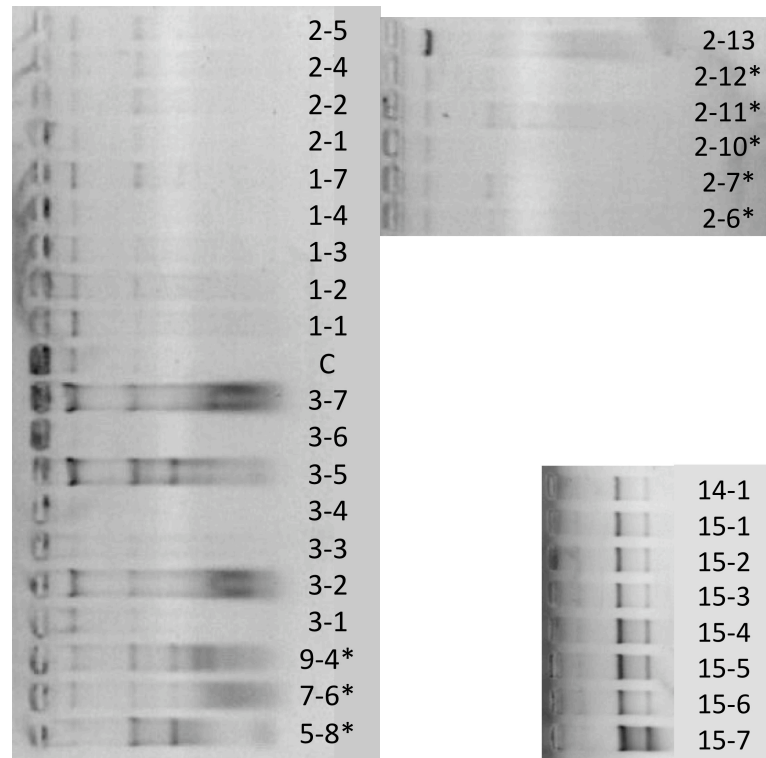


Figura 34. Terceira e quarta eletroforese para determinação da qualidade do RNA contido nas amostras.

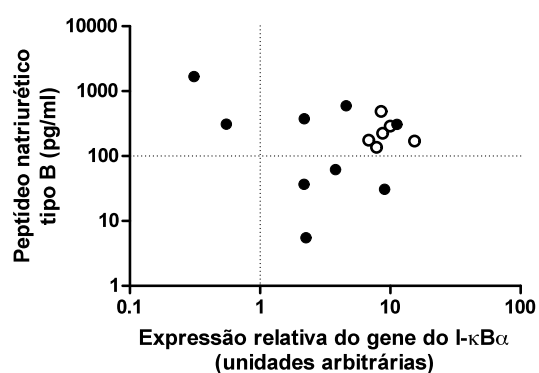
Legenda: \*= repetição de amostras cujo resultado não foi satisfatório nas primeiras placas; C= controle.

#### 8.4. Resultados da quantificação do RNA por espectrofotometria

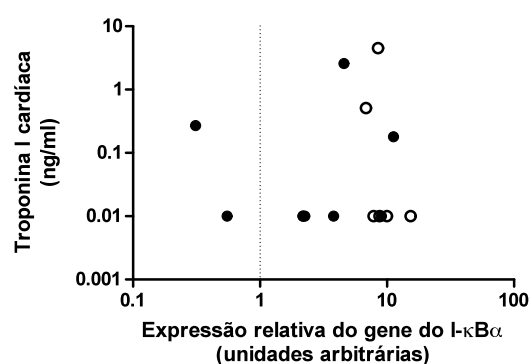
Amostra	Concentração de RNA (µg/ml)	Amostra	Concentração de RNA (µg/ml)	Amostra	Concentração de RNA (µg/ml)
1-1	1,9	4-6	3,6	8-10	2,9
1-2	0,9	4-7	1,5	8-11	2,2
1-3	0,6	5-1	10,1	9-1	4,0
1-4	1,5	5-2	6,3	9-2	5,7
1-5	2,3	5-3	5,4	9-3	5,0
1-6	1,6	5-4	5,8	9-4	2,8
1-7	1,4	5-5	3,3	9-5	5,7
2-1	0,9	5-6	7,8	10-1	3,2
2-2	1,6	5-7	8,9	10-2	4,4
2-3	1,4	5-8	2,5	10-3	3,9
2-4	1,8	5-9	7,0	10-4	3,1
2-5	1,9	5-10	7,9	11-1	1,9
2-6	1,9	5-11	11,6	11-2	3,0
2-7	0,9	5-12	8,6	11-3	1,7
2-8	3,0	5-13	8,0	12-1	2,2
2-9	0,7	6-1	2,6	13-1	7,5
2-10	1,2	6-2	2,0	13-2	8,4
2-11	0,5	6-3	2,9	13-3	6,4
2-12	1,2	7-1	3,3	13-4	12,6
2-13	2,0	7-2	4,0	13-5	5,2
3-1	1,4	7-3	4,9	13-6	5,3
3-2	5,0	7-4	3,7	13-7	5,2
3-3	2,3	7-5	7,4	13-8	6,1
3-4	1,2	7-6	4,4	14-1	5,3
3-5	3,8	8-1	6,2	15-1	1,8
3-6	0,6	8-2	6,6	15-2	2,9
3-7	6,6	8-3	3,9	15-3	2,9
4-1	8,4	8-4	2,9	15-4	1,5
4-2	5,4	8-5	5,8	15-5	1,7
4-3	3,9	8-6	5,3	15-6	1,7
4-4	2,2	8-7	3,1	15-7	1,4
4-5	3,7	8-8	3,6	Controle	3,0

## 8.5. Gráficos de correlação entre variáveis clínicas e laboratoriais

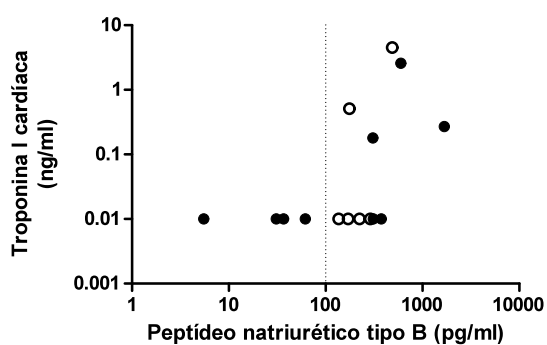
Os gráficos abaixo apresentam as principais correlações bivariáveis comentadas nos resultados, avaliadas no 1º dia. Os círculos fechados são pacientes do grupo 1, e os círculos abertos são pacientes do grupo 2.



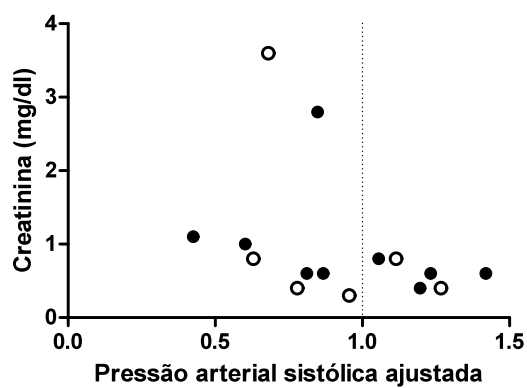
( $r=-0,18$ ;  $p=0,53$ )



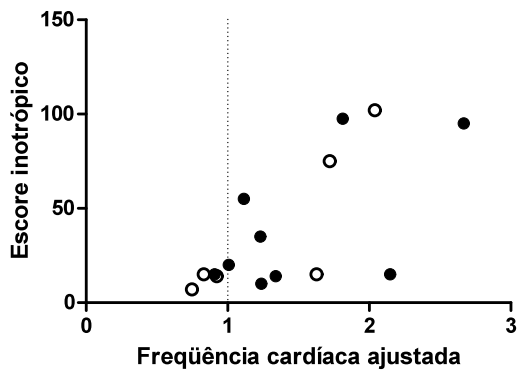
( $r=-0,01$ ;  $p=0,98$ )



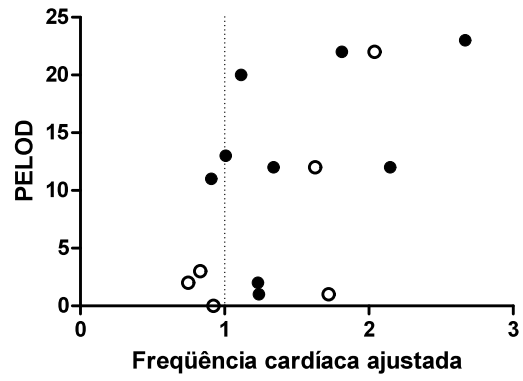
( $r=0,63$ ;  $p=0,01$ )



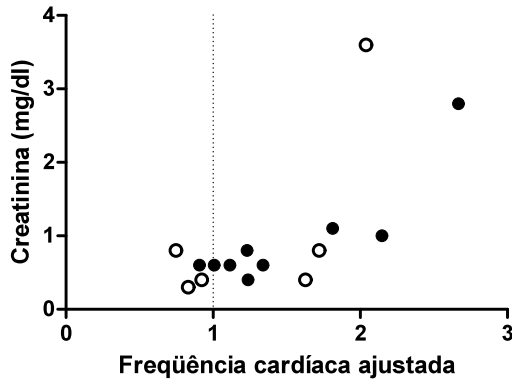
( $r=-0,54$ ;  $p=0,04$ )



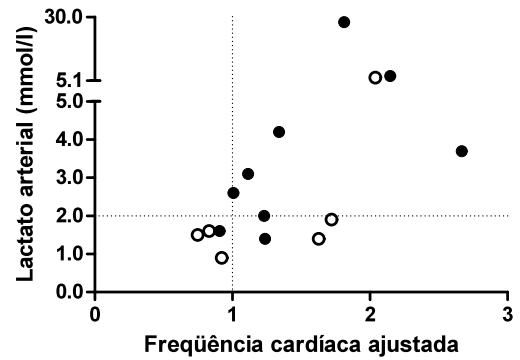
( $r=0,58$ ;  $p=0,02$ )



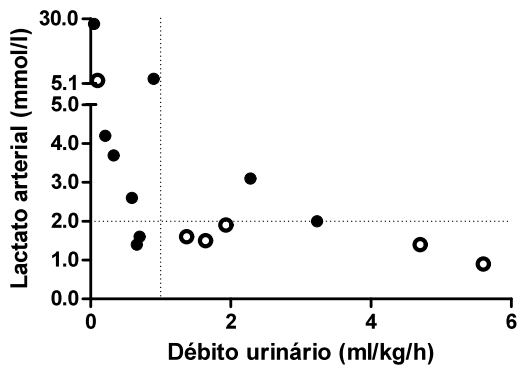
( $r=0,53$ ;  $p=0,04$ )



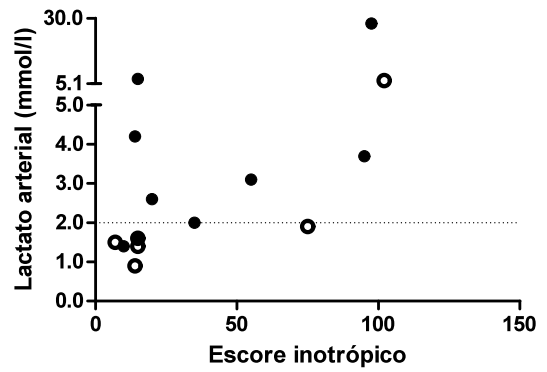
( $r=0,64$ ;  $p=0,01$ )



( $r=0,63$ ;  $p=0,01$ )

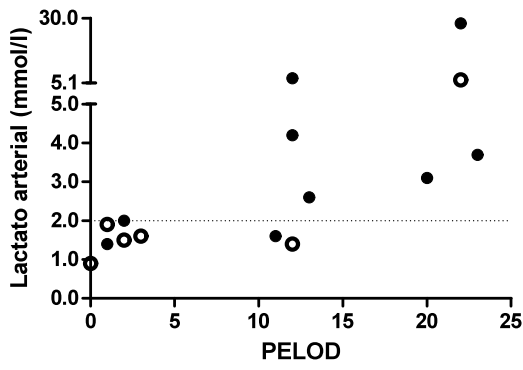


( $r=-0,67$ ;  $p=0,01$ )

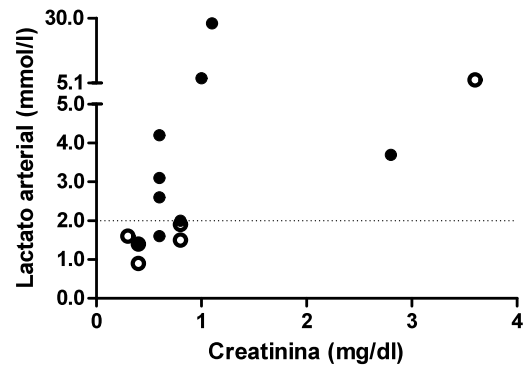


( $r=0,64$ ;  $p=0,01$ )

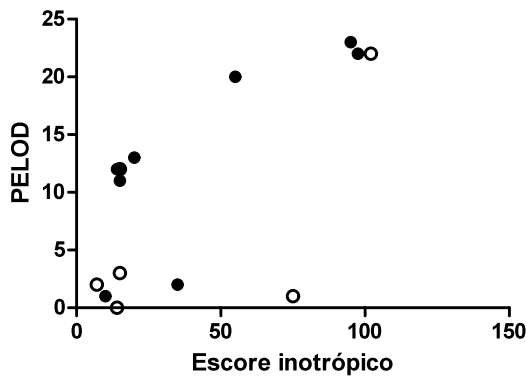




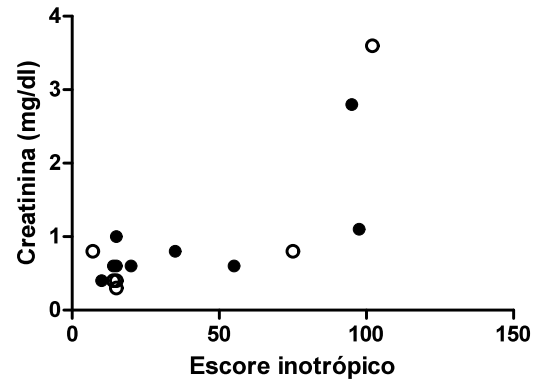
( $r=0,75$ ;  $p<0,01$ )



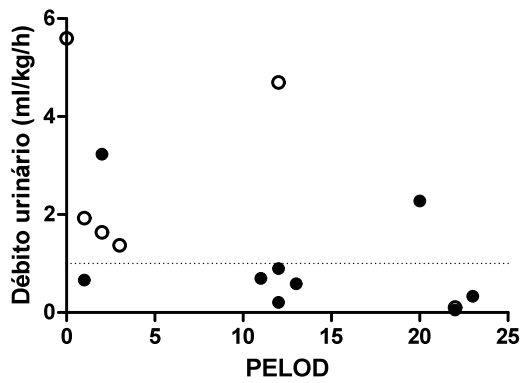
( $r=0,74$ ;  $p<0,01$ )



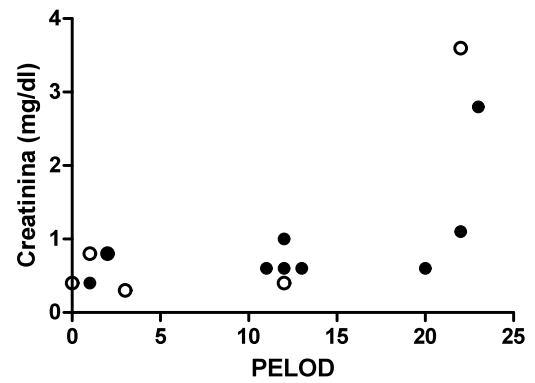
( $r=0,65$ ;  $p=0,01$ )



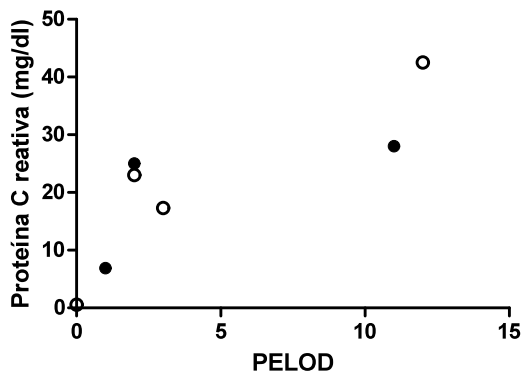
( $r=0,64$ ;  $p=0,01$ )



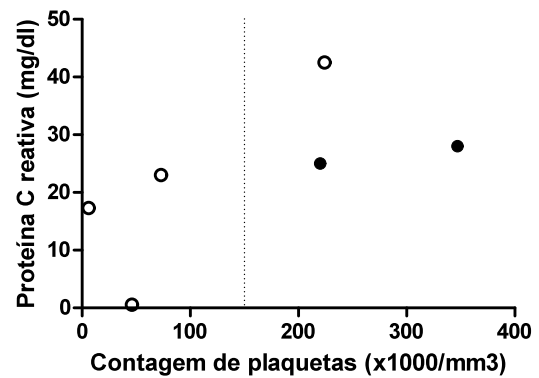
( $r=-0,62$ ;  $p=0,01$ )



( $r=0,54$ ;  $p=0,04$ )



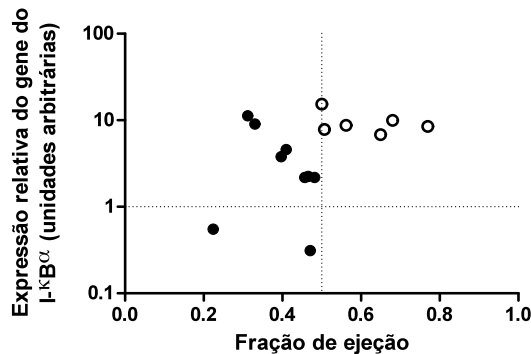
( $r=0,88$ ;  $p=0,01$ )



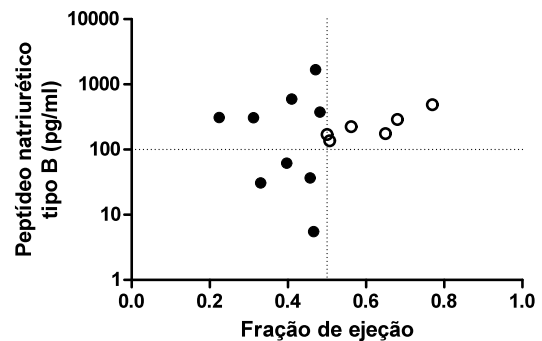
( $r=0,89$ ;  $p=0,02$ )

## 8.6. Gráficos de correlação entre variáveis clínicas e ecocardiográficas

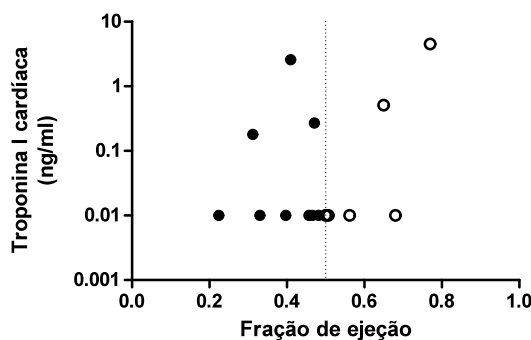
Os gráficos abaixo apresentam as principais correlações bivariáveis comentadas nos resultados, avaliadas no 1º dia. Os círculos fechados são pacientes do grupo 1, e os círculos abertos são pacientes do grupo 2.



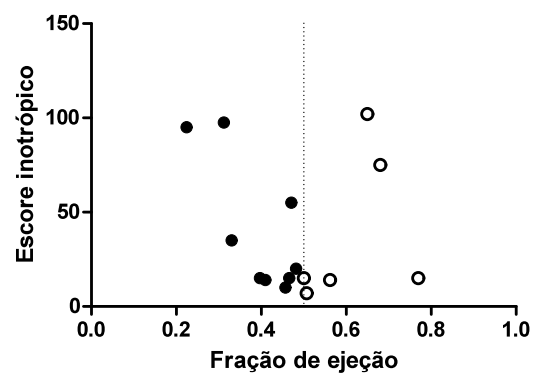
( $r=0,28$ ;  $p=0,31$ )



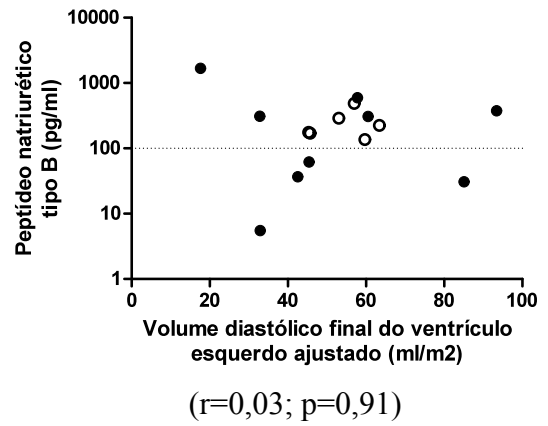
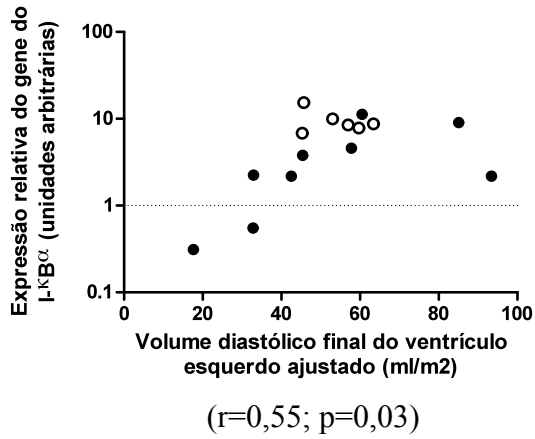
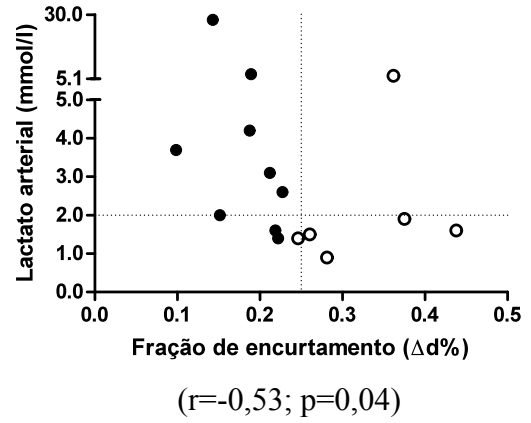
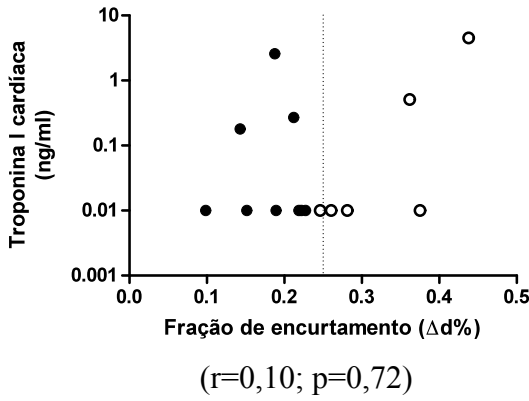
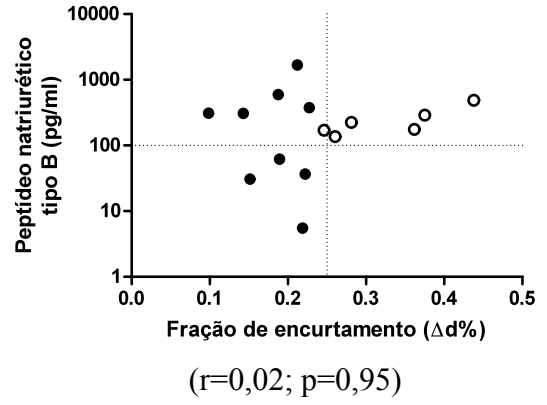
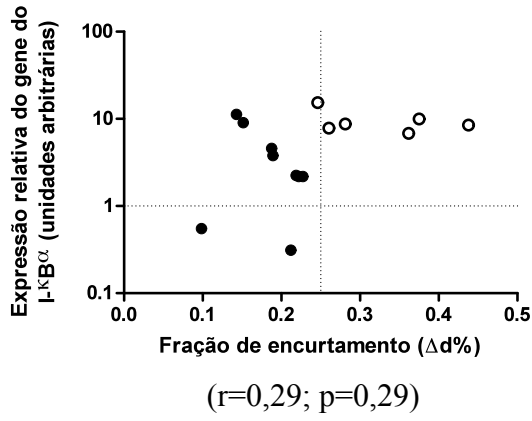
( $r=0,14$ ;  $p=0,62$ )

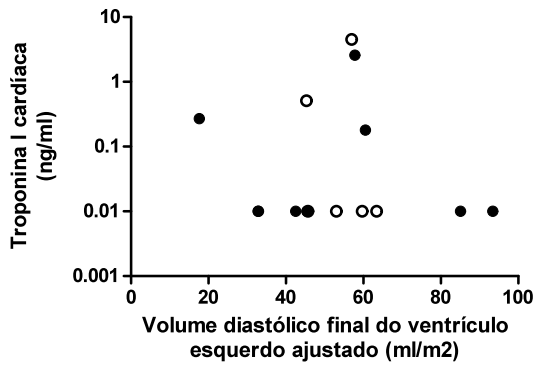


( $r=0,19$ ;  $p=0,49$ )

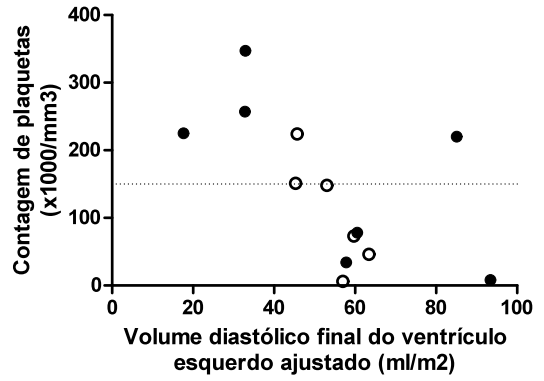


( $r=-0,15$ ;  $p=0,60$ )

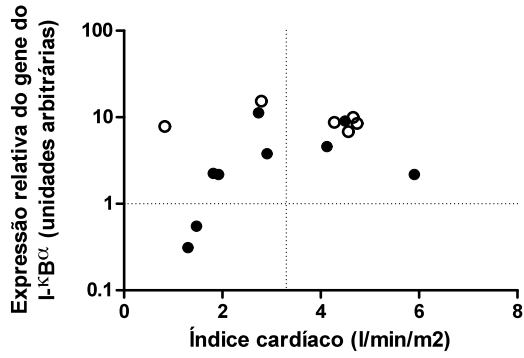




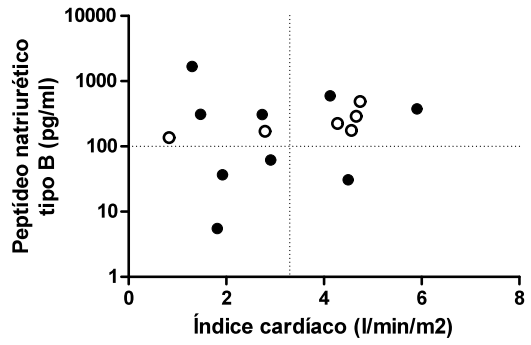
( $r=-0,08$ ;  $p=0,77$ )



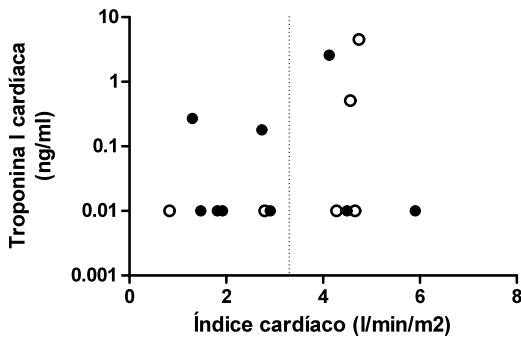
( $r=-0,69$ ;  $p=0,01$ )



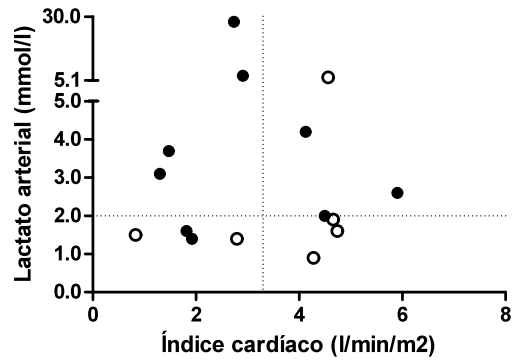
( $r=0,35$ ;  $p=0,20$ )



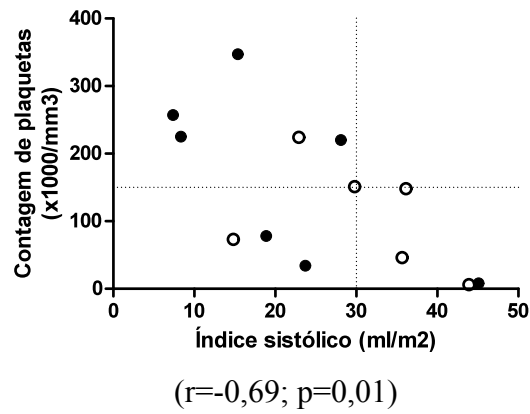
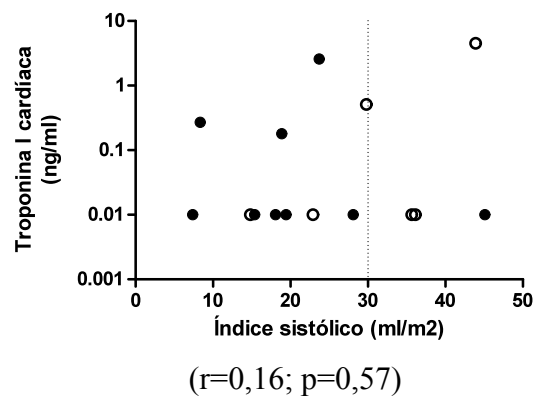
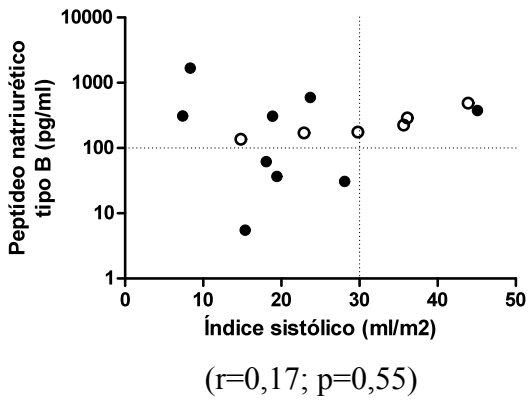
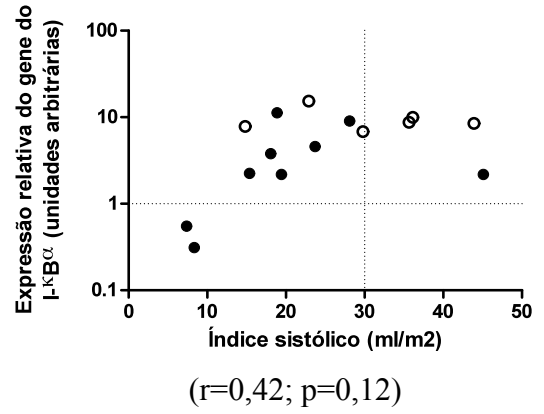
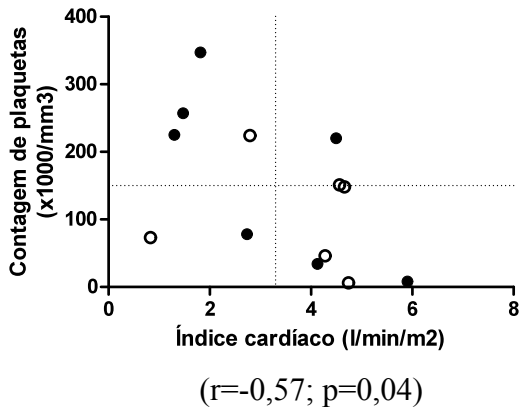
( $r=0,19$ ;  $p=0,51$ )



( $r=0,19$ ;  $p=0,49$ )




( $r=0,06$ ;  $p=0,84$ )



## 9. Anexos

### 9.1. Ofício de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

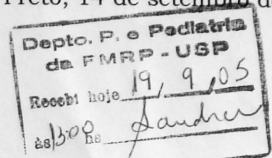

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

CEP. 14048-900  
RIBEIRÃO PRETO - S.P.  
BRASIL

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE  
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 14 de setembro de 2005

Ofício nº 2561/2005  
CEP/SPC



**Prezado Senhor:**

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO B E TROPONINA I CARDÍACA E DA ATIVAÇÃO DO FATOR NUCLEAR  $\kappa$ B EM NEUTRÓFILOS E CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E SUA CORRELAÇÃO COM A GRAVIDADE E A DURAÇÃO DA DISFUNÇÃO MIOCÁRDICA EM CRIANÇAS COM SEPSE GRAVE E CHOQUE SÉPTICO”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 210ª Reunião Ordinária realizada em 12/09/2005, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 6060/2005.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
 Coordenador do Comitê de Ética  
 em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor  
**FÁBIO CARMONA**  
**PROFª DRª ANA PAULA C. P. CARLOTTI(Orientadora)**  
 Depto. de Puericultura e Pediatria-Centro de Terapia Intensiva Pediátrica  
 Em mãos

## 9.2. Protocolo de separação do plasma e conservação do RNA

1. Limpeza da bancada de trabalho, das pipetas, caixas e demais materiais com solução RNase Away® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Utilizar pipetas exclusivas para RNA.
2. Centrifugação imediata do sangue coletado (3 ml em tubo com EDTA) a 3000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C.
3. Separar o plasma com uma pipeta, armazenando em tubos Eppendorf® (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e armazenar congelado a -70 °C.
4. Técnica para preservação do RNA:
  - Colocar em um tubo Falcon® 25 ml de tampão de lise (2,5 ml de bicarbonato de amônio e 22,5 ml de cloreto de amônio) (ver receitas no anexo 9.3);
  - Pipetar o *pellet* de células que sobrou do tubo com EDTA para o tubo o Falcon®, e misture por agitação;
  - Deixar descansando no gelo por 10 minutos;
  - Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C;
  - Desprezar o sobrenadante por inversão;
  - Lavagem rápida do *pellet*:
    - Aspirar 500 µl de PBS (*phosphate-buffered saline* – ver receita no anexo 9.4);
    - Encostar a ponteira na parede do tubo e liberar o PBS lentamente para não dissolver o *pellet*;
    - Desprezar o PBS por inversão cuidadosamente;
    - Repetir até retirar o excesso de coloração vermelha.

- Adicionar 500 µl de PBS e 1500 µl de Trizol LS® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA);
- Misturar bem a solução passando várias vezes pela pipeta (*up and down*) para dissociação de complexos nucleoprotéicos. Se achar muito viscoso adicionar mais 500 µl de PBS e 1500 µl de Trizol LS®;
- Deixar descansar por 5 minutos em temperatura ambiente, transferir a solução para tubos Eppendorf® e congelar imediatamente a -70 °C.

### 9.3. Receita do tampão de lise

- Misturar 9 partes (22,5 ml) de cloreto de amônio com 1 parte (2,5 ml) de bicarbonato de amônio:
  - Cloreto de amônio – 0,144 M em água contendo DEPC (dietilpirocarbonato).
  - Bicarbonato de amônio – 0,01 M em água contendo DEPC.

### 9.4. Receita do PBS (*phosphate-buffered saline*)

- Ingredientes para 1000 ml de solução:
  - Água destilada – 800 ml
  - NaCl – 8 g
  - KCl – 0,2 g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,44 g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,24 g
  - Adicionar água destilada para completar 1000 ml;



- Ajustar o pH para 7,40 usando HCl.

## 9.5. Protocolo de extração do RNA

1. Descongelar no gelo os tubos contendo o *pellet* de leucócitos e Trizol LS® armazenados na etapa anterior;
2. Adicionar 200 µl de clorofórmio aos tubos;
3. Adicionar 20 µl de glicogênio (20 mg/ml) e misturar por inversão durante 15 segundos;
4. Deixar descansar em temperatura ambiente por 10 minutos;
5. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C;
6. O resultado será a separação em 3 fases:
  - a. Fase superior (incolor): RNA
  - b. Fase intermediária (branca): DNA
  - c. Fase inferior (vermelha): proteínas
7. Com o auxílio de uma pipeta, transferir cuidadosamente a fase superior (sobrenadante) contendo RNA para outros tubos Eppendorf® previamente identificados;
8. Armazenar as fases restantes para posterior extração de DNA e proteínas em freezer a -70 °C;
9. Adicionar ao sobrenadante transferido 500 µl de isopropanol a 100% gelado;
10. Agitar manualmente por inversão e incubar *overnight* a -70 °C;
11. No dia seguinte, descongelar as amostras em gelo;
12. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C;

13. Verter o tubo, desprezando o sobrenadante (isopropanol), com cuidado para não desprezar o pequeno *pellet* branco (RNA);
14. Adicionar 1000  $\mu$ l de etanol a 75% gelado;
15. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C;
16. Verter o tubo, desprezando o sobrenadante (etanol), com cuidado para não desprezar o pequeno *pellet* branco (RNA);
17. Deixar secar o *pellet* lentamente, deixando o tubo meio invertido sobre papel toalha, em temperatura ambiente, até que o pellet fique quase invisível (transparente);
18. Ressuspender o *pellet* em 15  $\mu$ l de água contendo DEPC;
19. Incubar por 10 minutos a 60 °C;
20. Armazenar overnight a -20 °C e depois transferir para -70 °C.

## **9.6. Protocolo de avaliação da qualidade do RNA por eletroforese**

1. Diluir 1  $\mu$ l de cada amostra contendo RNA em 5  $\mu$ l de água contendo DEPC e adicionar 1  $\mu$ l de corante Dye;
2. Pipetar as amostras nos interior dos poços do gel de agarose a 1,2% (ver receita no anexo 9.7) cuidadosamente;
3. Submeter a eletroforese com 70 volts por 45 minutos;
4. Fotografar a placa em câmara escura com câmera digital (Kodak EDAS 290, Kodak Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Company, New Jersey, USA) e software apropriado (Kodak 1D Software v.3.6.2, Eastman Kodak Company, New Jersey, USA).

5. Os resultados contendo duas bandas de RNA foram considerados satisfatórios.

Quando houve contaminação com DNA, a amostra foi submetida a tratamento com DNase. Quando houve degradação do RNA, a amostra foi submetida a nova extração.

### **9.7. Preparação do gel de agarose a 1,2%**

1. Misturar 1,2 g de agarose com 100 ml de tampão TBE (ver anexo 9.8);
2. Aquecer no microondas por 1 minuto e 40 segundos;
3. Quando cessar a fervura, adicionar 2 µl de brometo de etídio;
4. Colocar sobre a placa de eletroforese preparada com o marcador de poços e deixar esfriar em temperatura ambiente.

### **9.8. Tampão TBE (Tris, Borato, EDTA)**

- Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) 107,81 g/l (0,89 M)
- EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético) 5,8 g/l (0,02 M)
- Ácido bórico 55 g/l (0,89 M)

### **9.9. Protocolo de quantificação do RNA**

1. Diluir 1 µl da amostra contendo RNA em 500 µl de água contendo DEPC;
2. Fazer a leitura por espectrofotometria (Eppendorf® BioPhotometer Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

### 9.10. Protocolo de síntese do DNA complementar

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com a utilização de kit comercialmente disponível (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada reação foram utilizados 2 µl de cada RNA extraído nos passos anteriores, adicionando-se:

- Buffer, 2,5 µl
- dNTP, 1 µl
- Random Primers, 2,5 µl
- Multiscribe, 1,25 µl
- RNase OUT, 0,63 µl
- Água com DEPC, 15,12 µl

O volume final da reação foi de 25 µl. A seguir, as amostras foram submetidas ao termociclador, com ciclos de PCR a 25 °C por 10 minutos, e a 37 °C por 120 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer a -20 °C até a realização do RQ-PCR.

### 9.11. Protocolo do RQ-PCR (PCR quantitativo em tempo real)

1. Diluir o cDNA 1:50 (1 µl de cDNA + 49 µl de água DEPC);
2. Em uma placa de PCR, adicionar em cada poço:
  - a. 6 µl de Mastermix (Taqman® Universal PCR Master Mix);
  - b. 1 µl da sonda específica (I-κBα ou GUS-β) (ver Metodologia);
  - c. 5 µl de cDNA diluído no item 1 ou 5 µl de água DEPC (para o controle branco).
3. Centrifugar a 2000 rpm por 2 minutos a 4 °C;

4. Inserir no aparelho de PCR (7500 Realtime PCR System, Applied Biosystems®):
  - a. Modo “Standard 7500” com 40 ciclos;
5. A leitura dos resultados (vide Metodologia).

### 9.12. Escore PRISM (*Pediatric Risk of Mortality*)

Variáveis	Variação de acordo com a idade		Pontos
	Lactentes	Maiores	
PA sistólica (mmHg)	130-160	150-200	2
	55-65	65-75	2
	>160	>200	6
	40-54	50-64	6
	<40	<50	7
PA diastólica (mmHg)	>110		6
FC (bpm)	>160	>150	4
	<90	<80	4
FR (irpm)	61-90	51-90	1
		>90	5
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <sup>a</sup>		Apnéia	5
		200-300	2
PaCO <sub>2</sub> (mmHg) <sup>b</sup>		<200	3
		51-65	1
Escala de coma de Glasgow <sup>c</sup>		>65	5
		<8	6
Reação pupilar		Anisocóricas ou dilatadas	4
		Fixas e dilatadas	10
TP/TTPA		>1,5 x controle	2
Bilirrubina total (mg/dl) <sup>d</sup>		>3,5	6
		3,0-3,5	1
Potássio (mEq/l)		6,5-7,5	1
		<3,0	5
		>7,5	5
		0,8-0,85	2
Cálcio iônico (mmol/l)		1,3-1,5	2
		<0,8	6
		>1,5	6
Glicemia (mg/dl)		40-60	4
		250-400	4
		<40	8
		>400	8
Bicarbonato (mmol/l) <sup>e</sup>		<16	3
		>32	3

Adaptado de (POLLACK et al., 1988)

Legenda: (a) não deve ser realizado em pacientes com *shunt* intracardíaco ou insuficiência respiratória crônica; existe a necessidade de se colher uma amostra de sangue arterial; (b) pode ser realizado com uma amostra de sangue capilar; (c) não pode ser realizado em pacientes com sedação, paralisia, anestesia ou disfunção neurológica crônica; (d) somente em crianças acima de 1 mês de idade; (e) pode-se utilizar os valores medidos.

### 9.13. Escore PELOD (*Paediatric Logistic Organ Dysfunction*)

Disfunção	Pontuação			
	0	1	10	20
<b>Neurológico*</b>				
Escala de coma de Glasgow	12-15	7-11	4-6	3
Reação pupilar	Ambas reativas	NA	Ambas fixas	NA
<b>Cardiovascular†</b>				
Frequência cardíaca (bpm)				
< 12 anos	≤ 195	NA	> 195	NA
≥ 12 anos	≤ 150	NA	> 150	NA
<b>Pressão arterial sistólica (mmHg)</b>				
< 1 mês	> 65	NA	35-65	< 35
1 mês – 1 ano‡	> 75	NA	35-75	< 35
1 ano – 12 anos‡	> 85	NA	45-85	< 45
≥ 12 anos	> 95	NA	55-95	< 55
<b>Renal</b>				
Creatinina (µmol/l)				
< 7 dias	< 140	NA	≥ 140	NA
7 dias – 1 ano‡	< 55	NA	≥ 55	NA
1 ano – 12 anos‡	< 100	NA	≥ 100	NA
≥ 12 anos	< 140	NA	≥ 140	NA
<b>Respiratório§</b>				
Relação PaO <sub>2</sub> (kPa)/FiO <sub>2</sub>	> 9,3	NA	≤ 9,3	NA
PaCO <sub>2</sub> (kPa)	≤ 11,7	NA	> 11,7	NA
Ventilação mecânica	Não	Sim	NA	NA
<b>Hematológico</b>				
Contagem de leucócitos (x10 <sup>9</sup> /l)	≥ 4,5	1,5-4,4	<1,5	NA
Contagem de plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l)	≥ 35	< 35	NA	NA
<b>Hepático</b>				
Aspartato transaminase (UI/l)	< 950	≥ 950	NA	NA
INR	< 1,40	≥ 1,40	NA	NA

Adaptado de (LETEURTRE et al., 2003)

Legenda: PaO<sub>2</sub> = pressão parcial arterial de oxigênio; FiO<sub>2</sub> = fração inspirada de oxigênio; PaCO<sub>2</sub> = pressão parcial arterial de gás carbônico; INR = *International normalised ratio*.

\* Escala de coma de Glasgow: usar o menor valor. Se o paciente estiver sedado, usar o escore anterior à sedação. Avaliar somente pacientes com doença aguda do sistema nervoso central conhecida ou suspeitada. Reação pupilar: pupilas arreatentes devem ter diâmetro > 3mm. Não avaliar após dilatação pupilar iatrogênica.

† Frequência cardíaca e pressão arterial sistólica: não avaliar durante o choro ou agitação iatrogênica.

‡ Estritamente menor que.

§ PaO<sub>2</sub>: usar somente medida arterial.

A relação PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, que não pode ser avaliada em pacientes com shunt intracardíaco, é considerada como normal em crianças com cardiopatia cianosante.

A PaCO<sub>2</sub> pode ser medida no sangue arterial, capilar ou venoso.

Ventilação mecânica: o uso de ventilação com máscara não deve ser considerado ventilação mecânica.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)