



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL

Efeito da drotrecogina alfa ativada na microcirculação em endotoxemia experimental –observação com a janela dorsal em hamster: Comparação com a ressuscitação volêmica

Maria Júlia Barbosa da Silva

Orientador: Prof^a Dr^a Eliete Bouskela

Co-Orientador: Prof Dr Nivaldo Ribeiro Villela

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL

**Efeito da drotrecogina alfa ativada na microcirculação em endotoxemia experimental
- observação com a janela dorsal em hamster: Comparação
com a ressuscitação volêmica**

Dissertação apresentada à Pós –graduação em Fisiopatologia
Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
para obtenção do grau de Mestre

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Erik Svensjö

Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar

Rio de Janeiro

2008



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL

Efeito da drotrecogina alfa ativada na microcirculação em endotoxemia experimental –observação com a janela dorsal em hamster: Comparação com a ressuscitação volêmica

Maria Júlia Barbosa da Silva

**Rio de Janeiro
2008**

Silva, Maria Júlia Barbosa da

Efeito da drotrecogina alfa ativada na microcirculação em endotoxemia experimental observada através da janela dorsal em hamster: comparação com a ressuscitação volêmica

/Maria Júlia Barbosa da Silva - 2008

XVI, 69 p. : 14.

Orientador: Profª Drª Eliete Bouskela

Co-Orientadora: Prof Dr Nivaldo Ribeiro Villela

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sepsis. 2. Proteína C ativada recombinante 3. Microcirculação. 4. Teses

I. Bouskela, Eliete e Villela, Nivaldo II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. Faculdade de Ciências Médicas. III. Efeito da drotrecogina alfa ativada na microcirculação em endotoxemia experimental – observação com a janela dorsal em hamster: Comparação com a ressuscitação volêmica

Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós, a Ele seja a glória para todo o sempre. Efésios 3.20

Aos meus meninos, Márcio e Cíntia, razão de todo meu esforço, por encherem minha vida de motivação, alegria e orgulho.

À memória de meus pais, José Octavio e Julieta, que, com humildade e amor, moldaram meu caráter e me ensinaram o valor do trabalho.

Agradecimentos

Aos colegas José Raimundo Araújo de Azevedo e Fernando Clapauch, verdadeiros mestres, que, pelo exemplo, despertaram em mim o desejo de tratar pacientes gravemente enfermos.

Às colegas Lucy Stella de Lucca Dourado e Maria de Lourdes Luzes Noronha, verdadeiras amigas, que me substituíram nas ausências, e com empenho fazem do CETIP do Hospital Cardoso Fontes motivo de orgulho.

À professora Eliete Bouskela, minha orientadora competente, por todas as oportunidades e pela firmeza nos tempos difíceis.

Ao professor Nivaldo Ribeiro Villela, meu co-orientador, pela ajuda paciente na apresentação, discussão e exposição dos resultados.

A Ana Olímpia Maia Teixeira dos Santos, pelo trabalho e companheirismo, descortinando-me o mundo dos modelos experimentais.

A Eliane Furtado pela boa-vontade, dedicação e trabalho.

Ao Fernando Lencastre Sicuro pelo auxílio estatístico.

Ao Waldício Soares pela ajuda na área da informática.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Microcirculação da UERJ, que possibilitou meu trabalho.

SUMÁRIO

1- Introdução.....	1
1.2- A inflamação.....	4
1.2.1- Resposta imune inata.....	4
1.2.2- Resposta imune adaptativa.....	8
1.3- A endotoxina.....	9
1.4- A coagulação.....	10
1.5- A interface inflamação-coagulação.....	14
1.6- A microcirculação.....	16
1.7- Proteína C ativada na sepse.....	20
1.8- Ações possíveis da Proteína C ativada.....	24
2- Objetivos.....	28
3- Materiais e Métodos.....	29
3.1- Análise estatística.....	34
4- Resultados.....	35
4.1- Diâmetro arteriolar.....	36
4.2- Diâmetro venular.....	38
4.3- Densidade capilar funcional.....	40
4.4- Adesão de leucócitos.....	43
4.5- Rolamento de leucócitos.....	46
4.6- Análise da sobrevida.....	48

5- Discussão.....	49
5.1- Considerações metodológicas.....	51
5.2- Discussão dos resultados.....	53
6- Conclusão.....	60
7- Referências bibliográficas.....	61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reação inflamatória aguda local	3
Figura 2 – Resposta inflamatória à sepse	7
Figura 3 – Ativação do monócito pelo LPS	9
Figura 4 – Esquema das vias da coagulação	12
Figura 5 – Esquema das vias de inibição da coagulação	13
Figura 6 – Câmara de titânio	30
Figura 7 – Hamster com câmara de titânio com detalhe da fixação do cateter e câmara	31
Figura 8 – Animal ao microscópio em tubo de acrílico	31
Figura 9 – Variação do diâmetro arteriolar / diâmetro arteriolar basal nos diversos grupos	37
Figura 10 – Variação do diâmetro venular / diâmetro venular basal nos diversos grupos	39
Figura 11 – Variação da densidade capilar funcional / densidade capilar funcional basal	42
Figura 12 – Variação do número de leucócitos aderidos nos diversos grupos	45
Figura 13 – Variação do número de leucócitos rolantes nos diferentes grupos	47
Figura 14 – Curva de sobrevida proporcional (Kaplan-Meier)	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variação diâmetro arteriolar	36
Tabela 2: Variação do diâmetro venular	38
Tabela 3: Densidade capilar funcional	40
Tabela 4: Adesão de leucócitos por nos diferentes grupos	43
Tabela 5: Rolamento de leucócitos nos diferentes grupos	46
Tabela 6: Sobrevida em dias nos diferentes grupos	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT III – antitrombina III

C – fração do complemento

CO₂ – gás carbônico

DA – diâmetro arteriolar

DCF – densidade capilar funcional

DMOS – disfunção múltipla de órgãos e sistemas

DV – diâmetro venular

EPCR – receptor endotelial da proteína C

FT – fator tecidual

GC – grupo controle

ICAM – moléculas de adesão intercelular

I κ B – inibidor do fator nuclear κ B

IL – interleucina

IFN - interferon

INOS – óxido nítrico sintase induzível

LPS – lipopolissacarídeo

MCP – proteína quimiotóxica para monócitos

NF κ B – fator de transcrição nuclear κ B

NK – linfócito T citotóxico

NO – óxido nítrico

O₂ – oxigênio

OPS – espectroscopia ortogonal com luz polarizada

PAF – fator ativador de plaquetas

PAI – inibidor do ativador do plasminogênio

PAMP - padrões moleculares associados ao patógeno

PC – proteína C

PCA – proteína C ativada

PCAr – proteína C ativada recombinante

PS – proteína S

RV – ressuscitação volêmica

T - trombina

TAFI – inibidor da fibrinólise ativado por trombina

TFPI – inibidor da via do fator tecidual

TLR – receptores Toll

TM – trombomodulina

TNF α - fator de necrose tumoral α

VCAM – molécula de adesão vascular

RESUMO

Objetivos: Estudar *in vivo* os efeitos da proteína C ativa recombinante (PCAr) humana (drotrecogina alfa ativada) na microcirculação em animais submetidos à endotoxemia sem hipotensão.

Desenho do estudo: Experimental, intervencionista, prospectivo, randomizado e controlado.

Materiais e métodos: Foram usados hamsters machos com idade entre 6 e 8 semanas, com massa corporal entre 60 e 80 g, anestesiados para a colocação de uma câmara dorsal e cânula na veia jugular. Após 1 semana, foi induzida a endotoxemia com injeção venosa de 2 mg/kg de massa corporal, em “bolus” do lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, exceto no grupo controle. Uma hora após a injeção de LPS, os animais foram alocados, randomicamente, em grupos diferentes: **Controle** – nenhuma infusão ou tratamento; **LPS**- aplicação de NaCl a 0,9%, com o mesmo volume/hora usado para infusão da PCAr; **RV** - ressuscitação volêmica (40 ml/kg de massa corporal de NaCl 0,9% em 1 h; **PCAr**– aplicação de PCAr na dose de 24 µg/kg de massa corporal/h durante 5 h; **RV/PCAr** – aplicação do tratamento combinado. Os parâmetros microcirculatórios observados antes, 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção de LPS foram diâmetros arteriolar e venular, densidade capilar funcional (DCF), adesão e rolamento de leucócitos. A sobrevivência dos animais nos diversos grupos foi também investigada.

Resultado: A endotoxemia causou redução do diâmetro arteriolar e da DCF e aumento da adesão e rolamento de leucócitos. A PCAr reduziu a adesão de leucócitos nas 24 h nos grupos PCAr e RV/PCAr. A ressuscitação volêmica melhorou a DCF na avaliação de 24 h após LPS e esta melhora foi ainda mais expressiva quando a RV foi associada à PCAr. O tratamento com RV, PCAr ou sua combinação aumentou significativamente a sobrevivência dos animais. O tratamento com PCAr após LPS, não alterou significativamente o número de leucócitos rolantes ou os diâmetros arteriolar ou venular. Não houve sangramento observável nos animais tratados.

Conclusão: Em endotoxemia, o tratamento com PCAr, mas não a ressuscitação volêmica, reduziu a adesão leucócito-endotélio. Ambos, PCAr e RV, melhoram a sobrevivência dos animais tratados com LPS e fazem recrutamento da microcirculação, com efeitos aditivos quando combinadas.

SUMMARY

Objectives: To study *in vivo* the effects of recombinant human activated protein C (Drotrecogin alfa activated) on the microcirculation of animals subjected to endotoxemia without hypotension.

Study design: Experimental, intervencionist, prospective, randomized and controlled.

Materials and methods: Male hamsters, age between 6 and 8 weeks, body mass between 60 and 80 g were anesthetized for the placement of a dorsal camera and a catheter in the jugular vein. One week after, endotoxemia was induced with a bolus intravenous injection of 2 mg/kg of body mass of lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli*, except the control group. One hour after LPS injection, the animals were randomly allocated in different groups: **Control** – no infusion or treatment; **LPS-** application of 0.9% NaCl instead of PCAr; **RV** – volumetric resuscitation (40 ml/kg body mass of NaCl 0.9% in 1 h; **PCAr**– application of PCAr in the dose of 24 µg/kg body mass/h during 5 h; **RV/PCAr** – application of combined treatment. Microcirculatory parameters were observed before, 1, 3, 6 and 24 hours after LPS injection: arteriolar and venular diameters, functional capillary density (DCF), leukocyte adhesion and rolling. Survival time in different groups was investigated.

Results: Reduction of arteriolar diameter and DCF and increased leukocyte rolling and sticking were observed after endotoxemia. Treatment with PCAr reduced leukocyte adhesion at 24 h in groups PCAr and RV/PCAr. Volumetric resuscitation improved DCF in the evaluation at 24 h after LPS and this amelioration was even more pronounced when RV was combined with PCAr. Treatment with RV, PCAr or their combination significantly increased survival. Treatment with PCAr, after LPS, did not significantly change the number of rolling leukocytes or arteriolar and venular diameters. No bleeding was observed in treated animals.

Conclusion: In endotoxemia, treatment with PCAr, but not the volumetric resuscitation, reduced leukocyte-endothelium interaction. Both, PCAr and RV, improved survival of animals treated with LPS and recruited the microcirculation, with additive effects when combined.

1. Introdução:

A sepse é a maior causa de morte em pacientes hospitalizados, a terceira causa de morte em sociedades desenvolvidas, afetando cerca de 18 milhões de pessoas por ano no mundo, com crescimento esperado de 1% a cada ano (Ulloa and Tracey, 2005). Nos Estados Unidos a incidência é de 50-95 casos por 100 000 pessoas por ano, 9% delas evoluindo para sepse grave ou choque séptico (Annane et al., 2005), custando ao país mais de US\$ 16 bilhões anualmente com o tratamento. Apesar do conhecimento cada vez maior da patogênese da sepse, do uso de antibióticos mais potentes e de suporte tecnológico para monitorar e tratar pacientes sépticos em unidades de terapia intensiva, o número de mortes por sepse cresce a cada ano. A causa para esta incidência crescente é multifatorial: o uso de procedimentos invasivos para diagnóstico e tratamento, a maior sobrevivência de pessoas nos extremos da vida, um maior número de pessoas imunocomprometidas, com doenças crônicas ou malignas, além do advento crescente de germes multirresistentes (Balk, 2004).

Duas Conferências Internacionais de Consenso para Definições de Sepse (1991 e 2001), definiram infecção como a resposta inflamatória local a microorganismos ou a invasão de tecidos, fluidos ou cavidade do corpo normalmente estéril, por germes patogênicos ou potencialmente patogênicos (Levi, 2003). De forma bastante simplista, sepse tem sido definida como uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada à infecção (Balk, 2004). Há uma relação complexa e estreita entre infecção e sepse. A infecção refere-se à presença do microorganismo e sepse relaciona-se à resposta do hospedeiro à infecção. A sepse é uma síndrome complexa caracterizada por ativação simultânea da inflamação e da coagulação em resposta a um insulto microbiológico. Estes eventos manifestam-se como

uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) com liberação de citocinas pró-inflamatórias, substâncias procoagulantes e moléculas de adesão pelas células imunes ou pelo endotélio agredido (Cunneen and Cartwright, 2004). Na sepse ocorre o caos no organismo (Haas, 2002). É um processo multissistêmico, com expressões clínicas muito variáveis, iniciado pela invasão do organismo por um germe patogênico. Esta invasão causa inflamação inicialmente restrita ao órgão invadido (infecção), despertando respostas imunes em série para combater o invasor.

O evento inicial da resposta imune é o reconhecimento que o organismo deve fazer do invasor. Este reconhecimento inicial faz parte da resposta imune inata (não adaptativa), que independe do contato prévio entre invasor (patógeno) e invadido (hospedeiro), e é feito por macrófagos teciduais que têm receptores codificados por DNA para padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) (Mariscalco, 2006). Os PAMPs são componentes altamente conservados, essenciais à estrutura do patógeno, compartilhados por classes inteiras de bactérias, vírus e fungos, sendo essenciais para sua sobrevivência e patogenicidade. Os lipopolissacarídeos bacterianos (presentes na membrana externa de todas as bactérias Gram negativas), o peptidoglicano (constituente da parede celular das bactérias), a dupla hélice RNA dos vírus são representantes importantes dos PAMPs (Mariscalco, 2006). A interação PAMP e macrófago deflagra a liberação de citocinas, especialmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) (fig.1). Estas citocinas atuam sobre as células endoteliais das vênulas pós-capilares causando exsudação de líquidos e expressão de moléculas de adesão na superfície de várias células. Os leucócitos fixam-se a estas moléculas de adesão e migram para o local onde estão os patógenos, para fagocitá-los e destruí-los. As moléculas de adesão e as citocinas estimulam também plaquetas, através dos PAFs (fatores ativadores de

plaquetas); plaquetas ativadas se unem formando tampões, além de liberarem mais substâncias inflamatórias (Mariscalco, 2006).

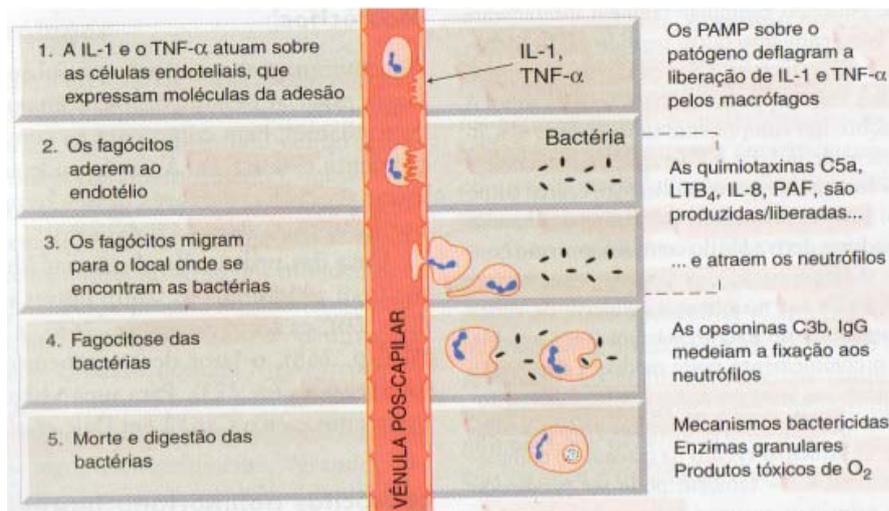


Figura 1 – Reação inflamatória aguda local

Rang,Dale,Ritter,Moore: *Pharmacology*, 5th ed. 2003

Esta primeira linha de defesa (interação PAMP com receptores celulares do hospedeiro) estimula a cascata inflamatória, a da coagulação e a do complemento (Aird, 2003; Mariscalco, 2006). Com a ativação da coagulação há a geração de trombina e formação de rede de fibrina. Esta rede de fibrina não apenas estabiliza o tampão de plaquetas, mas imobiliza os patógenos na superfície dos leucócitos, facilitando a fagocitose e destruição desses germes. Estas reações, inicialmente locais, podem transformar-se em reações em cadeia, havendo estímulo à resposta imune adaptativa, com envolvimento dos linfócitos, amplificando assim tanto a inflamação quanto a coagulação .

A sepsé humana tem um enorme grau de complexidade. Há grande dificuldade em se estabelecer quando é o seu início, que dados clínicos e laboratoriais marcariam este começo

e de que forma grandes cirurgias, traumas, queimaduras e infecções de diversos focos podem desencadeá-la.

A coagulação sanguínea e a inflamação são respostas universais à infecção e há uma interface entre coagulação e inflamação, em que uma pode ampliar ou reduzir a resposta da outra (Esmon, 2004). A perda de interação apropriada entre estes dois sistemas contribui para a morbidade e mortalidade em doenças infecciosas (Esmon, 2004).

1.2 A inflamação:

O termo inflamação refere-se a mudanças celulares, vasculares e teciduais que ocorrem após a agressão por um patógeno ou por um agente agressor físico ou químico. Em geral engloba um componente inato (não adaptativo), que independe de contato prévio com o patógeno, e outro componente adaptativo (resposta específica) que depende de um contato prévio com o agente agressor. Estas reações são necessárias para a defesa do organismo e integram nosso arsenal de combate às agressões. A inflamação serve também como sentinela de agressões, participa do reparo de feridas e de lesões celulares e teciduais. A reação inflamatória é portanto uma reação protetora do organismo, enquanto apropriada e limitada. Esta reação envolve elementos celulares e vasculares.

1.2.1 Resposta imune inata

Os mecanismos evolutivos mais primitivos de reconhecimento e combate aos microorganismos fazem parte da resposta imune inata, que não necessita da exposição prévia aos agentes infecciosos, porém deflagra respostas específicas. O sistema imune inato de defesa desenvolveu-se como um sistema de resposta rápida para detectar e expulsar microorganismos invasores, que tenham alcançado a intimidade tecidual de organismos

multicelulares (Opal, 2003). Os sistemas de coagulação e o da imunidade inata coevoluiram de um substrato ancestral comum no desenvolvimento dos organismos eucarióticos formando um circuito altamente integrado de sinais e de elementos de controle que defendem o hospedeiro após um dano tecidual ou um germe invasor (Opal, 2003). Esta resposta imune inata foi por muito tempo colocada em plano inferior, sendo considerada uma reação primitiva e temporária até que respostas mais eficazes fossem iniciadas. Hoje, no entanto, sabe-se que a primeira linha de defesa orgânica é fundamental para o bloqueio da agressão em sua fase inicial e suas ações se mantêm enquanto a agressão se mantiver. A primeira linha de defesa contra a agressão microbiológica envolve as células com função imune primordial (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas) e as que fazem parte da estrutura de órgãos como as células endoteliais dos vasos sanguíneos e as epiteliais intestinais, por exemplo. Os TLRs (Toll-like receptors) formam uma grande família de receptores celulares que têm papel principal no comando das respostas imuno-inflamatórias; esta família combina-se com estruturas moleculares de superfície encontradas em todos os germes (PAMPs), porém não expressas nas células do hospedeiro humano (Annane et al., 2005). A interação desses PAMPs com os TLRs sinaliza para o hospedeiro a invasão e inicia reações em série envolvendo células e substâncias cuja missão é a destruição do agressor. O hospedeiro é avisado da agressão e da sua magnitude, e responde com sinalizações ainda bastante misteriosas (Opal, 2005). Os patógenos expressam múltiplos PAMPs que são reconhecidos por diferentes TLRs, havendo redundância e certamente cooperação entre diferentes TLRs (Poll and Levi, 2004; Doherty and Arditi, 2005). Os PAMPs dos germes Gram positivos (peptidoglicano e lipopeptídeos) são reconhecidos pelos TLRs2, que interagem com os TLRs 6 e 1 (Hoffmann et al., 2004). Os TLRs 4 interagem com os

lipopolissacárides (PAMPs dos germes Gram negativos) e com os PAMPs do bacilo da tuberculose.

Mutações na expressão dos TLRs podem contribuir para a susceptibilidade individual a determinados agentes infecciosos específicos e para as diferenças individuais na evolução das doenças. Exemplos de maior susceptibilidade a infecções são os defeitos em genes tipo IRAK-4, envolvidos na ativação do TLR específico ou do fator nuclear NF κ B (Levi et al., 2003).

A interação portanto dos PAMPs com seus receptores “Toll” específicos codificados pelo DNA do hospedeiro e expressos nas células imunes chamadas de células apresentadoras de antígenos, (macrófagos teciduais), deflagra a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Fig.1) (Annane et al., 2005). Inicialmente são liberados o TNF α (fator de necrose tumoral alfa) e a IL-1 (interleucina 1) (Abreu and Arditi, 2004). Estas citocinas (TNF α e IL-1) atuam sobre as células endoteliais das vênulas pós-capilares. O aumento da permeabilidade permite a exsudação de líquidos com mais mediadores inflamatórios, amplificando assim a resposta. O TNF α e a IL-1 induzem a ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B (Fig.2). Nas células não estimuladas, o NF κ B encontra-se inativado pela ligação com seu inibidor, o I κ B. Pela ação do TNF α e da IL-1, as células iniciam a transcrição de genes da síntese de outros mediadores inflamatórios e imunológicos (Doherty and Arditi, 2005).

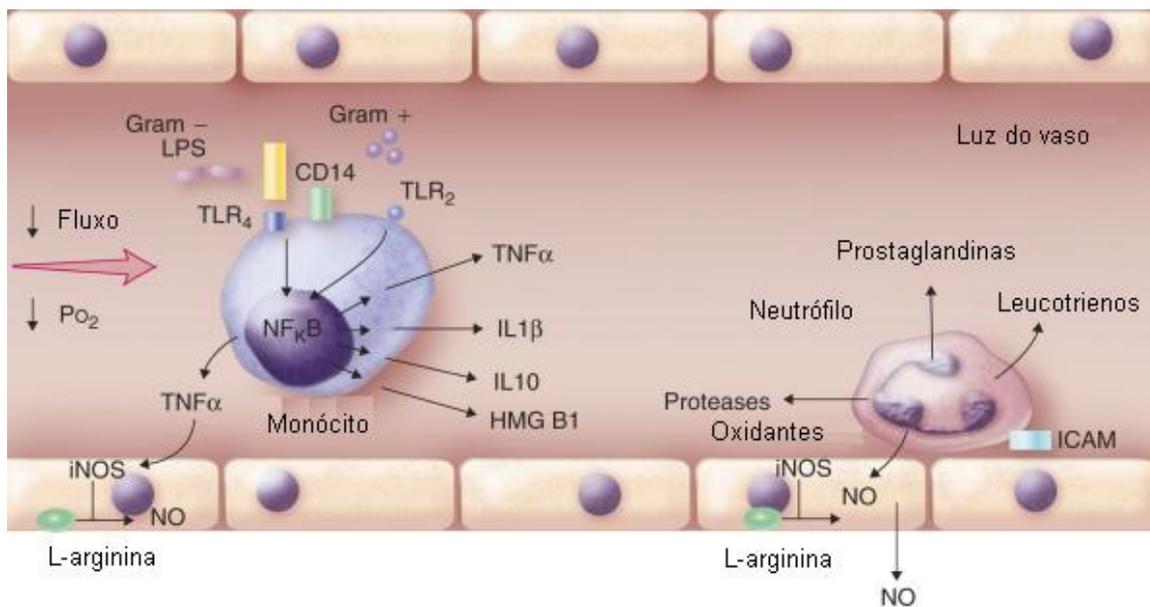


Figura 2 – Resposta inflamatória à sepse

Goldman: Cecil medicine, 23rd ed. 2007

O $TNF\alpha$ e a IL-1 estimulam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais das vênulas pós-capilares. Outras citocinas liberadas com a interação TLR-PAMP são os fatores quimiotáticos, que contribuem para o combate tecidual aos microorganismos invasores (Annane et al., 2005). Estas quimiocinas controlam a migração de leucócitos. Desta migração participam outros mediadores que não são citocinas, entre eles estão frações do complemento (C5a) assim como algumas interleucinas (IL-8) (Mariscalco, 2006).

Os polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) constituem a primeira linha de defesa do organismo e são os primeiros leucócitos a chegar na área agredida através da corrente sanguínea. Os neutrófilos aderem ao endotélio através da interação das moléculas de adesão expressas em sua superfície (integrinas) e na superfície das células endoteliais ativadas (família das selectinas e moléculas de adesão intercelular, as ICAMs)

(Mariscalco, 2006). Os neutrófilos atraídos pelas quimiotaxinas podem sair dos vasos sanguíneos, indo até o local onde se encontra o agente infeccioso. As quimiotaxinas, substâncias que atraem as células inflamatórias para locais específicos, podem ser produzidas por macrófagos e pelas próprias bactérias. A morte dos germes é ocasionada pela liberação de produtos tóxicos dos neutrófilos, por exemplo, os radicais livres de oxigênio (Mariscalco, 2006). Os mononucleares (monócitos) chegam ao tecido afetado horas após a chegada dos polimorfonucleares, com padrão semelhante de migração e adesão. Eles transformam-se em macrófagos, que ligando-se aos PAMPs, dentre eles o LPS, liberam citocinas que atuam sobre as células endoteliais, ativam-nas, facilitando a adesão do endotélio aos elementos figurados do sangue (Mariscalco, 2006).

1.2.2 Resposta imune adaptativa

A resposta imune adaptativa é específica, dependente de cada patógeno, mais intensa contra o agressor. Os linfócitos são os principais elementos celulares participantes da resposta imune específica, que é iniciada quando o macrófago, após fagocitar o microorganismo agressor, digere-o e o apresenta aos linfócitos T CD4 e linfócito T CD8. O linfócito T CD4 “virgem”, isento de contato prévio com certo antígeno, transforma-se em célula T capaz de sintetizar citocinas inflamatórias, que estimulam a produção de células T auxiliares nulas (Th0). As células Th0 podem se transformar em Células Th1, produtoras de citocinas inflamatórias específicas e células T de memória imunológica. As células Th1 liberam citocinas IL-2 e IFN γ . A IL-2 estimula a produção tanto de CD4 quanto de CD8, ativando o caminho de auto-estimulação. As células Th0 podem também se transformar em células Th2, produtoras de citocinas inflamatórias de outros grupos e células ou se transformarem em linfócitos B produtores de anticorpos. Os linfócitos T CD8 expressam

receptores para IL-2, que por função autócrina induzem sua modificação para linfócitos T citotóxicos (NK). A IL-2 e o IFN γ ativam os macrófagos, estimulando-os a produzir IL-1 e TNF α .

1.3 A endotoxina

A resposta à endotoxina ou lipopolissacarídeo, componente da membrana das bactérias Gram negativas, é um exemplo da resposta imune inata (Abreu and Arditi, 2004; Doherty and Arditi, 2005; Annane et al., 2005; Mariscalco, 2006). Pequenas quantidades de LPS são detectadas pelas proteínas ligadoras de LPS, pelos TLRs-4 e pelos linfócitos CD-14. A partir da ligação do LPS com estes componentes nos macrófagos, há ativação do fator de transcrição NF κ B, que atuando no núcleo dos macrófagos promove a produção de enzimas e citocinas para o combate à infecção (Abreu and Arditi, 2004; Doherty and Arditi, 2005; Annane et al., 2005; Mariscalco, 2006) (Fig.3).

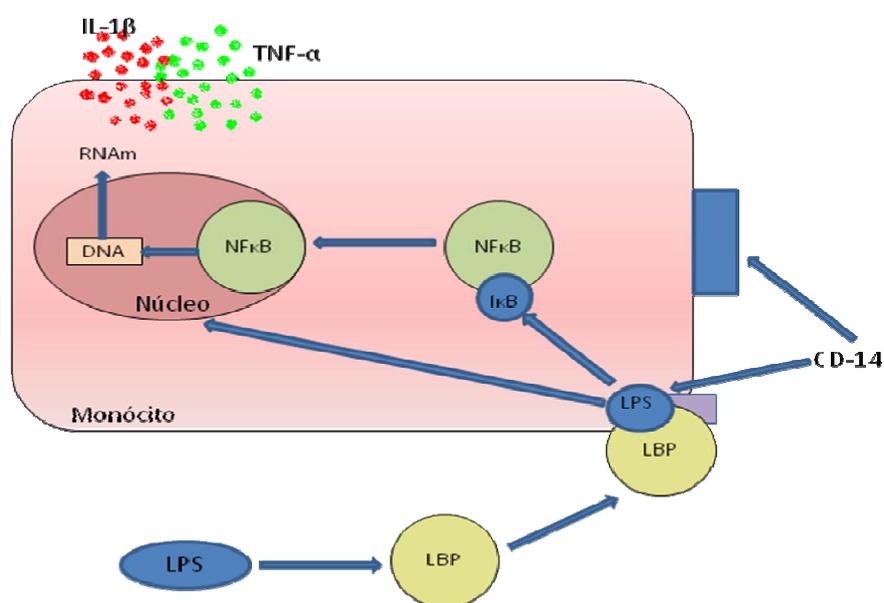


Figura 3 - Ativação do monócito pelo LPS

1.4 A coagulação

Virtualmente, todos os pacientes com sepse têm anormalidades na coagulação sanguínea (Levi, 2008). Estas anormalidades vão desde alterações sutis detectadas apenas por marcadores sensíveis, passando por redução na contagem de plaquetas e prolongamento do tempo de coagulação, até alterações muito graves, como a coagulação intravascular disseminada (Levi, 1993; Levi, 2008).

A coagulação sanguínea refere-se à transformação do sangue líquido num coágulo (gel). A hemostasia é o processo que garante a fluidez do sangue, e também a rápida formação de coágulos que permite a interrupção da perda sanguínea de um vaso lesado, por exemplo. A coagulação é também parte integrante dos mecanismos inatos de combate às infecções (Opal, 2003; Esmon, 2004). O sistema da coagulação limita a perda de elementos vitais do meio interno, seguindo-se à injúria mecânica do sistema circulatório (Opal, 2003). O balanço entre fluidez sanguínea e formação de trombos depende do ajuste fino entre fatores procoagulantes e anticoagulantes. O principal evento na cascata da coagulação é a geração de trombina, que transforma o fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis de fibrina. A geração da trombina envolve uma cascata de enzimas, presentes no sangue em forma de precursores inativos. Estes precursores são ativados por proteólise de forma sequencial; a ativação de pequena quantidade de um fator catalisa formação de maiores quantidades do fator seguinte. Após o estímulo da coagulação ser deflagrado, a cascata da coagulação amplifica-se, até que grandes quantidades de trombina sejam geradas (Esmon, 2006). Mecanismos anticoagulantes naturais, por exemplo a via da proteína C, são amplificados para evitar o excesso de formação de fibrina (Esmon, 2006). Cada passo na ativação da cascata coagulatória é limitado por reações anticoagulantes, através de inibidores da coagulação, entre eles a antitrombina III, que neutraliza praticamente todas as

proteases da cascata. A fibrina pode ser formada por duas vias principais, tradicionalmente denominadas de via intrínseca e extrínseca (Fig.4). A via intrínseca, assim chamada por estarem todos os seus componentes presentes no sangue, seria melhor denominada de via de contato, já que é ativada quando o sangue entra em contato com uma superfície artificial. Importante via de ativação da coagulação da sepse é a via extrínseca, iniciada pela ativação do fator tecidual (Levi, 2008). O fator tecidual (FT) é uma proteína transmembrana, constitutivamente expressa em numerosas células do corpo que só entra em contato com o sangue quando é rompida a integridade vascular ou quando células do sangue passam a expressá-lo (Levi, 2008). Portanto, a denominação de via extrínseca, à luz do conhecimento atual, já não é tão própria, já que, a ativação do FT pode se dar dentro da corrente circulatória; o fator tecidual pode ser expresso na superfície de células endoteliais ativadas ou de células inflamatórias, de forma independente da lesão vascular (Levi, 2008). A via intrínseca da coagulação é ativada a partir do fator XII, ativando seqüencialmente os fatores até o X; a via extrínseca é ativada a partir de um dano endotelial ou trauma celular, que libera o FT, que por sua vez ativa e combina-se com o fator VII, e o complexo FT-VIIa ativa o fator X. A partir da ativação do fator X, a cascata da coagulação segue uma via comum (Fig. 4).

Além do sistema da coagulação com seu grupo de proteases, fazem parte do controle da hemostasia a parede vascular (endotélio), as plaquetas e o sistema fibrinolítico.

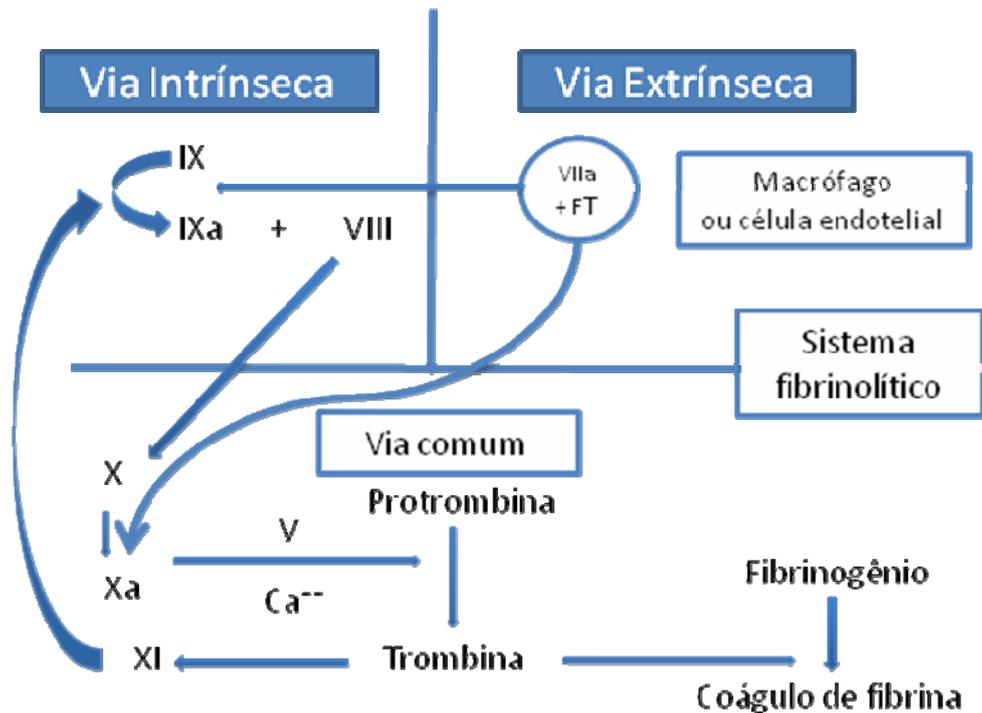


Figura 4 – Esquema das vias da coagulação

O controle da cascata da coagulação é feito por 3 vias: a via da antitrombina, inibidor da via do fator tecidual (TFPI) e a via da proteína C (Levi, 2008). A antitrombina III (ATIII) é um potente inibidor da cascata da coagulação, formando um complexo com a trombina inibindo-a, inibindo também os fatores XII, XI, IX, X, plasmina e caliceína ativados. A antitrombina bloqueia também o complexo fator VII-FT, liga-se aos glicosaminoglicanos das células endoteliais induzindo a síntese de prostaciclina, que por sua vez inibe a agregação plaquetária, a expressão de moléculas de adesão e a ligação de neutrófilos às células endoteliais. A ATIII também reduz a liberação de cininas inflamatórias. O inibidor da via do FT, sintetizado principalmente na célula endotelial, controla a via extrínseca da coagulação ao se ligar com o complexo FT-VIIa, inibindo-o em sua fase inicial (Levi, 2008) (Fig. 5).

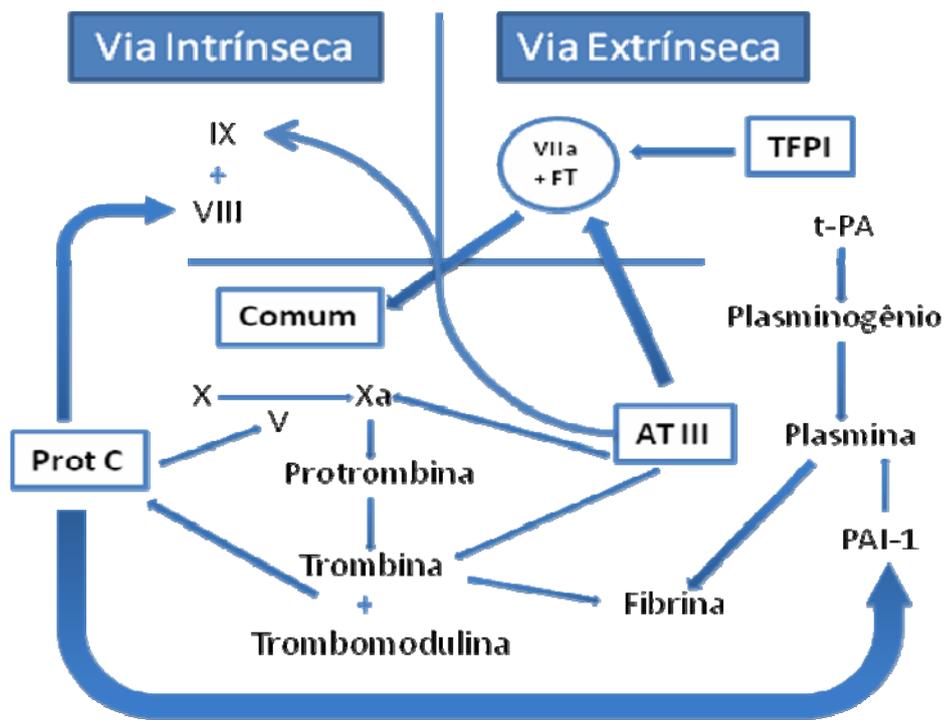


Figura 5 – Esquema das vias de inibição da coagulação

O sistema fibrinolítico tem por finalidade a “digestão” do fibrinogênio e da fibrina, fazendo parte do controle da coagulação. O plasminogênio deposita-se sobre a rede de fibrina formada, sendo transformado em plasmina pela ação de seus ativadores. A plasmina, uma protease, atua sobre ligações do fibrinogênio e da fibrina, digerindo-os, degradando assim o coágulo. A plasmina inativa também os fatores II, V e VII da coagulação. Quando a coagulação é ativada, o sistema fibrinolítico também é ativado através dos ativadores do plasminogênio sintetizados pelo endotélio, através da calicreína, da elastase dos neutrófilos e do ativador da fibrinólise. Os inibidores da fibrinólise são o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI), sintetizado pelo endotélio e pelas plaquetas e o inibidor da fibrinólise ativado por trombina. Nos quadros inflamatórios agudos há, inicialmente, uma resposta de

liberação de ativadores da fibrinólise, os ativadores do plasminogênio (tipo tecidual e tipo uroquinase) (Levi, 2008). No entanto esta ativação na sepse é aos poucos bloqueada pelo aumento gradual e sustentado do PAI, conduzindo a um estado de fibrinólise incompleta e inibida (Levi, 2008).

1.5 A interface inflamação-coagulação

No final do século XVIII, William Hewson afirmou que, em doenças febris e inflamatórias, havia a formação inadequada de coágulos. Desde então, muito se avançou na compreensão dos processos de inflamação e coagulação, porém apenas mais recentemente têm sido delineados os mecanismos moleculares que fazem esta ligação, ocorrendo na intimidade vascular esta interação (Van de Wouwer et al., 2004). As ligações moleculares entre os dois sistemas são inquestionáveis; inflamação promove coagulação aumentando a expressão do FT, das moléculas de adesão e reduzindo as vias fibrinolíticas e a via da PC (Esmon et al., 1999). Mediadores inflamatórios como LPS e TNF α causam maior expressão do fator tecidual em monócitos e no endotélio, deflagrando a cascata coagulante (Esmon, 2000). A inflamação desvia os mecanismos hemostáticos a favor da trombose (Esmon, 2004) e a trombina, por sua vez aumenta a resposta inflamatória (Esmon et al., 1999). Uma infinidade de mecanismos unem estes sistemas biológicos tanto nos estados basais quanto nos estados infecciosos.

Inflamação e coagulação, quando fisiologicamente controladas, causam confinamento do patógeno agressor nas malhas de fibrina que se forma, facilitando tanto a fagocitose do germe pelas células do sistema imune, quanto a sua destruição pela ação de substâncias tóxicas, como as espécies reativas de oxigênio. Na sepse, além da ativação da via extrínseca da coagulação, via ativação do fator tecidual, há uma atenuação das respostas

anticoagulantes naturais (Aird, 2001): redução dos níveis circulantes da proteína C e de antitrombina III, redução da expressão de trombosmodulina na superfície das células endoteliais e bloqueio da fibrinólise (Aird, 2001). Tudo isto resulta num estado pró-coagulante visto nos quadros de sepse: excessiva formação de trombosmodulina e de fibrina e consumo dos fatores da coagulação (Aird, 2003).

As vias inflamatórias e as coagulantes iniciam uma relação viciosa auto-alimentadora, em que a ativação de uma interage com a outra, amplificando-a. Assim tanto mediadores inflamatórios estimulam a expressão do FT, das células imunes e endoteliais, quanto várias proteínas da coagulação, quando ativadas, interagem com receptores das células imunes e do endotélio estimulando a liberação de mediadores inflamatórios. A célula endotelial ativada atrai plaquetas, monócitos e neutrófilos e estes, por outro lado, iniciam e amplificam a coagulação. A IL-6 aumenta a expressão do fator tecidual, enquanto o TNF α interage com IL-6 para estimular a produção de PAI-1.

A trombosmodulina (fator V da coagulação) é a proteína final responsável pela geração de fibrina. Ela induz mudanças na forma e na função da célula endotelial, alterando sua permeabilidade, resposta proliferativa e promovendo adesão de leucócitos (Aird, 2003). Com sua atuação, a célula endotelial expressa várias moléculas de adesão, entre elas E-selectina, P-selectina, ICAM-1 (molécula de adesão inter-celular) e VCAM-1 (molécula de adesão vascular). O conjunto da expressão destas moléculas de adesão na superfície do endotélio e de células imunes é responsável pelos fenômenos de rolamento e aderência dos leucócitos no endotélio venular pós-capilar. A trombosmodulina também induz a célula endotelial a secretar o fator de von Willebrand, a IL-8, o MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos), o fator ativador de plaquetas (PAF) e fatores de crescimento (Aird, 2003).

Enfim há importante ligação entre inflamação e coagulação, que se descontroladas e mantidas, certamente determinam mau prognóstico para pacientes sépticos (Vincent and De Backer, 2005). Pesquisas recentes apontam para a importante função do glicocálix, constituinte da camada mais superficial do endotélio, na interação entre inflamação e coagulação; o glicocálix tem funções antioxidantes, de barreira vascular e mediador da vasodilatação relacionada ao NO (Levi, 2008). A lesão do glicocálix endotelial pode resultar na geração de trombina e adesão plaquetária em poucos minutos.

1.6 A microcirculação

A alteração da microcirculação tem papel fundamental na patogênese da sepse e choque séptico e leva à disfunção multiorgânica e à morte (Ragaller et al., 2007). A disfunção microcirculatória é o pivô das manifestações clínicas da sepse grave (Trzeciak and Rivers, 2005) e é clinicamente relevante porque é um marcador de mortalidade: melhora rapidamente nos pacientes com maior chance de sobreviver (Bateman and Walley, 2005; Sakr et al., 2004). Os índices iniciais de perfusão microcirculatória são marcadamente mais alterados nos não-sobreviventes que nos sobreviventes de sepse grave e choque séptico e correlacionam-se com a gravidade da disfunção cardiovascular global (Trzeciak et al., 2007).

Constam da microcirculação os vasos sanguíneos e linfáticos com diâmetros inferiores a 100 μm . São eles as arteríolas, as metarteríolas, os capilares, as vênulas, as comunicações artério-venosas (“shunts”), pequenos vasos do sistema linfático, estruturas perivasais e o fluido intersticial. Em relação à função, os vasos da microcirculação podem ser divididos em vasos de resistência que controlam o fluxo sanguíneo aos órgãos (arteríolas, metarteríolas e esfíncteres pré-capilares), vasos reservatório de volume (vênulas) e os vasos

de troca (capilares). As vênulas podem ser musculares e não musculares, sendo as últimas envoltas por tecido conjuntivo.

A disfunção microcirculatória e a depressão da função mitocondrial são as condições que perpetuam a hipóxia regional e a deficiência de extração de O₂ na sepse e no choque séptico, a despeito da correção das variáveis sistêmicas de fornecimento de oxigênio (Ince, 2005). Olhar a microcirculação e identificar suas anormalidades são ferramentas que num futuro bem próximo ajudarão na definição de gravidade da sepse, que não tem sido possível com a avaliação de variáveis hemodinâmicas sistêmicas nem variáveis sistêmicas de fornecimento e consumo de O₂ (Ince, 2005).

O leito capilar inicia-se na metarteríola, onde há muitas vezes um envoltório de células musculares lisas: o esfíncter pré-capilar. A inervação simpática (vasoconstrictora) estende-se até às arteríolas e ocasionalmente até às metarteríolas (Guyton, 2002). O controle do fluxo sanguíneo capilar dá-se principalmente pela contratura do esfíncter pré-capilar, da musculatura lisa da metarteríola e das anastomoses arteriovenosas (Guyton, 2002). Como normalmente a musculatura do esfíncter e da metarteríola não possui inervação, o controle é feito por produtos do metabolismo regional, por temperatura, pela pressão transmural. A musculatura responde também a substâncias vasoativas sintetizadas à distância. O TNF-alfa tem importante papel na indução da óxido nítrico-sintetase (iNOS). A proteína C ativada (PCA), inibindo o TNF α , pode evitar a hipotensão induzida por endotoxina, por inibir a produção excessiva de NO (Isobe et al., 2001). A hipóxia, por exemplo, causa vasodilatação com aumento do fluxo sanguíneo e maior aporte de oxigênio local (Guyton, 2002).

Produtos metabólicos como o H⁺, o lactato, o CO₂, podem atuar como vasodilatadores, aumentando o fluxo capilar em resposta à taxa metabólica local. O fluxo

sanguíneo capilar é determinado pela pressão arterial, pela viscosidade sanguínea e pelo tônus vascular. A viscosidade, entre outros fatores, depende dos elementos figurados do sangue (do hematócrito ou quantidade de hemácias e da sua deformabilidade, da quantidade de leucócitos) e de proteínas de alto peso molecular. O fluxo sanguíneo capilar é bastante lento, da ordem de 0,3 mm/s, facilitando as trocas entre sangue e tecido. Sendo a hemácia de maior diâmetro que um capilar, para atravessá-lo a hemácia perde sua forma bicôncava, alongando-se. A plasticidade ou deformabilidade da hemácia é portanto elemento crucial para a normalidade do fluxo sanguíneo capilar.

O endotélio é o revestimento interno de todo o sistema circulatório desde as grandes artérias e veias até à rede capilar. Contém cerca de 10^{13} células endoteliais, que juntas somam 1 quilo de tecido e cobrem uma superfície entre 4000 e 7000 m² (Aird, 2003). O endotélio tem importante papel no controle seletivo de transporte capilar de água e solutos, regula a passagem de células entre a corrente sanguínea e a intimidade dos tecidos, participa do controle da proliferação celular, da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), da regulação do tônus vasomotor, mantém a fluidez do sangue e estimula a coagulação quando necessário, participa do equilíbrio inflamação e antiinflamação, da cicatrização de lesões teciduais, da geração de trombos e da fibrinólise (Aird, 2003). A ativação do endotélio não necessariamente está ligada a um processo de doença, mas pode representar resposta a processos fisiológicos naturais (Aird, 2003). As respostas endoteliais que beneficiam o hospedeiro são ditas funcionais ou fisiológicas. O termo disfunção endotelial é reservado para os casos em que a ativação do endotélio, local ou sistêmica, é inapropriada, excessiva e mantida, que ao invés de proteger o hospedeiro, agride-o.

A célula endotelial é fundamental na condução destes eventos e é alvo de estudos de intervenção terapêutica (Aird, 2003). Por sua localização privilegiada, seu contato íntimo

com praticamente todos os tecidos e órgãos do corpo, a célula endotelial, juntamente com os monócitos e macrófagos teciduais, participa da resposta imune inata.

O endotélio vascular tem papel ativo no controle da hemostasia e na manutenção da fluidez sanguínea com sua superfície não trombogênica. Possui em sua superfície um glicosaminoglicano relacionado à heparina (sulfato de heparan), um co-fator da antitrombina III, que juntamente com outros produtos plaquetários, como a prostaglandina I₂ (prostaciclina) e com o óxido nítrico, acabam por inibir a ativação plaquetária (Esmon, 2004).

O receptor endotelial da proteína C (EPCR) e a trombomodulina têm alto nível de expressão no endotélio não ativado e convertem a PC em sua forma ativa, conservando a superfície endotelial não-trombogênica (Scaldaferri et al., 2007). Em células endoteliais intestinais humanas isoladas, a administração de PCAr tem potentes efeitos antiinflamatórios, como demonstrado pela redução da expressão de moléculas e produção de citocinas assim como a inibição da adesão de leucócitos (Scaldaferri et al., 2007).

O tônus vasomotor depende de mecanismos endoteliais e de mecanismos extra-endoteliais. A célula endotelial produz substâncias vasoativas que controlam o tônus arteriolar. Na sepse, o balanço entre liberação de vasodilatadores (óxido nítrico, fator hiperpolarizante e prostaciclina...) e vasoconstrictores (endotelina, tromboxano A₂, ânions superóxidos, PAF...) está alterado.

Muitas pesquisas são feitas para disponibilizar a visão da microcirculação dos pacientes e assim orientar a terapêutica. Métodos diretos de avaliação do fluxo microcirculatório são a microscopia intravital e as imagens de espectroscopia ortogonal com luz polarizada (OPS) (De Backer et al., 2006). Vários estudos em animais têm ajudado a compreensão dos eventos patológicos na microcirculação durante processos infecciosos.

Os modelos animais ajudam a compreensão de etapas fisiopatológicas no desenvolvimento de tão patologia intrincada e multifatorial. A técnica de observação da microcirculação *in vivo*, realizada em animais não anestesiados, foi descrita por Endrich e colaboradores em 1980. Esta técnica permite uma avaliação dinâmica e prolongada da microcirculação em modelo animal não anestesiado, com análise da densidade capilar funcional, da interação dos leucócitos com o endotélio microvascular e o diâmetro vascular antes e após a administração do LPS. Leucócitos rolantes são os que se movem sobre a superfície do endotélio em baixa velocidade, estabelecendo íntimo contato com as células endoteliais. Leucócitos aderentes são os que não mais se movem, encontrando-se paralisados ou aderidos à linha endotelial em pelo menos 30 segundos de observação.

1.7 Proteína C ativada na sepse

A heterogeneidade do fluxo sanguíneo capilar na sepse resulta em hipóxia tissular local, que causa inflamação tecidual, impede a extração de O₂ e culmina com disfunção orgânica. Isto, associado ao fato de que a ressuscitação da pressão arterial média e do débito cardíaco isoladamente não melhoram a função microvascular, tornam o recrutamento microcirculatório um objetivo terapêutico na sepse e no choque séptico (Bateman and Walley, 2005). As estratégias para alcançar esse recrutamento incluem a ressuscitação volêmica, uso criterioso de inotrópicos e de vasopressores ou de vasodilatadores, o controle das funções reológicas e da coagulação (Ince, 2005; Bateman and Walley, 2005). Os trabalhos de Lehmann e colaboradores, publicados em 2008, demonstraram que o tratamento com PCAr, em ratos submetidos a LPS, foi capaz de melhorar o fluxo microcirculatório e reduzir a liberação de IL-1 causada pela endotoxina.

Muitos mecanismos têm sido relacionados ao desenvolvimento de disfunção orgânica na sepse grave. Entre estes, a ativação das cascatas inflamatórias e da coagulação, junto com a disfunção endotelial, têm sido os mais implicados (De Backer, 2007). A proteína C é uma protease plasmática, vitamina K dependente, produzida no fígado, que circula no plasma em sua forma inativa. Quando ativada exerce um papel central na modulação do endotélio vascular e faz importante interface com o sistema imune inato (Joyce et al., 2004; O'Brien et al., 2004). Inicialmente foram identificadas apenas as propriedades antitrombóticas da PCA, nas suas ações inibitórias sobre os fatores V e VIII da coagulação. No início da década de 1990, suas propriedades antiinflamatórias foram atribuídas à inibição da geração da trombina (Macias et al., 2005). Na metade dos anos 90 foi identificado o receptor endotelial da PC (EPCR), que hoje sabe-se não ser específico da PC nem ser exclusivo da célula endotelial. O EPCR foi detectado também em células efectoras do sistema imune inato, como neutrófilos e eosinófilos (Joyce et al., 2004). As atividades biológicas da PC podem ser classificadas em 2 categorias relacionadas ou à limitação da geração de trombina ou aos efeitos iniciados por sua ligação ao EPCR (Macias et al., 2005). Estudos *in vitro* demonstram que sinalizações celulares são iniciadas com a interação da PCA ao seu receptor endotelial, levando à redução de alterações de permeabilidade endotelial induzidas pela trombina; a combinação da PCA às células sanguíneas, epiteliais e neurônios conduz a inibição da quimiotaxia e da apoptose e tem efeitos neuroprotetores, respectivamente (Macias et al., 2005). A redução da migração de leucócitos em resposta a citocinas é também mediada pelo EPCR (Joyce et al., 2004). O complexo PCA-EPCR está envolvido nos mecanismos de redução da formação de citocinas como TNF α e IL-6 (Esmon, 2003). O complexo PC-EPCR pode bloquear a adesão entre leucócito e endotélio (Esmon, 2001). Estas propriedades da PCA são consistentes com

grande número de estudos em animais que demonstram que a PCA pode reduzir danos leucocitários aos pulmões e outros tecidos e reduzir a hipotensão, em resposta à sepse e processos inflamatórios (Esmon, 2001; Okajima, 2004). O trabalho de Bilbault e colaboradores (2007), utilizando células mononucleares circulantes de pacientes com choque séptico, demonstrou efeitos antiapoptóticos da PCA sobre estas células.

A ativação da PC envolve a trombina, a trombomodulina, o EPCR e a proteína S; a trombina (T) combina-se com a trombomodulina (TM) e este complexo (T-TM), na superfície endotelial, ativa a PC, numa velocidade 1000 vezes maior que trombina livre (Esmon, 2003); a ativação tem como co-fator a proteína S, e pode ser amplificada em até 20 vezes quando ocorre no EPCR (Esmon, 2003; Okajima, 2004).

Na sepse, tanto a síntese da PC inativa quanto sua ativação estão comprometidas. Estudos *in vivo* utilizando a forma não ativada da PC falharam em demonstrar qualquer benefício. A indústria farmacêutica conseguiu obter por engenharia genética a forma já ativada recombinante da proteína C humana, que foi chamada de drotrecogina alfa ativada (Xigris®- Eli Lilly) (PCAr). Os efeitos farmacodinâmicos da PCAr foram relacionados com 15 biomarcadores sistêmicos de hemostasia, inflamação e disfunção endotelial (Dhainaut et al., 2003). A proteína C ativada tem portanto ações anticoagulantes, antiinflamatórias e promotoras da fibrinólise (Cerchiara et al., 2007).

O estudo **PROWESS** (Recombinant human **PRO**tein C **Worldwide Evaluation in Severe Sepsis**; phase III) publicado no New England Journal Medicine em 2001 (Bernard et al., 2001) mostrou uma pesquisa envolvendo 1690 pacientes com sepse grave, estudados de forma randomizada, nos grupos placebo (n=840) e grupo de tratamento (n=850). O uso da PCA humana recombinante, infundida na dose de 24 µg/kg/hora por um total de 96 horas,

reduziu a mortalidade em 28 dias de 30,8% para 24,7%, sendo o tratamento associado a redução em 20 vezes do risco relativo de morte por sepse grave (95% intervalo de confiança e $p=0,006$). Já haviam sido tentadas terapêuticas com a proteína C não ativada em pacientes sépticos, sem redução na mortalidade ou morbidade.

O controle da inflamação, da anticoagulação e da fibrinólise na sepse, pela via da proteína C, pode estar muito comprometido. As causas relacionadas com a inibição desta via são:

a- redução dos níveis de trombomodulina:

A trombomodulina (TM) é uma glicoproteína da superfície da célula endotelial, que combinando-se com a trombina é capaz de ativar a proteína C. A redução dos níveis de TM compromete portanto a ativação da PC. Na sepse há redução da síntese e expressão da trombomodulina, pela ação das citocinas inflamatórias TNF-alfa e IL-1; há maior degradação da trombomodulina pelas elastases dos neutrófilos, havendo sua liberação para a circulação como TM solúvel.

b- redução dos níveis de proteína C

A redução nos níveis de proteína C (PC) na sepse ocorre por diversos fatores: há menor síntese hepática tanto por desvio de função para a produção de proteínas de fase aguda quanto por disfunção hepática que pode ocorrer na sepse, quanto por deficiência de vitamina K. Algumas das proteínas de fase aguda aumentadas nos quadros de sepse são a alfa1-antitripsina, o inibidor da proteína C, a B₂ macroglobulina (que também é inibidor da PC) e o C4BP, que é um inibidor da proteína S (Dhainaut et al., 2002). Há perda da PC para o interstício por aumento da permeabilidade capilar; há maior degradação da proteína C por elastases dos neutrófilos; há depleção plasmática da PC pela rápida conversão na sepse da PC em PCA.

A PCA tem níveis reduzidos em mais de 90% dos pacientes pediátricos e adultos com sepse, e que há uma relação inversa entre os níveis de PCA e morbidade/mortalidade nestes pacientes (Dhainaut et al., 2002). Nos estados de ativação inflamatória sistêmica, a perda da PC por consumo resulta no comprometimento da modulação da coagulação, redução no controle da própria inflamação e nas funções de sobrevivência celular. Este comprometimento conduz à disfunção vascular, falência orgânica e morte (Grinnell and Joyce, 2001). A reposição de PCAr pode modular estas desordens, com possibilidade de melhorar o prognóstico da sepse.

c- redução dos níveis da proteína S

Níveis circulantes de proteína S (PS) estão reduzidos nos estados sépticos (Esmon, 2004). A redução na síntese hepática, a perda por extravasamento capilar e pela ação de inibidores, entre eles o C4BP, respondem pela redução nos níveis de proteína S durante eventos sépticos. Sendo a proteína S (PS) o co-fator necessário para a ativação da PC, a sua redução acarreta redução simultânea da PCA.

1.8 Possíveis ações da Proteína C ativada

Ações anticoagulantes:

O papel local da ação anticoagulante da PCA é na microcirculação, onde se dá seu mecanismo de ativação. A via da proteína C é importante no controle dos mecanismos de anticoagulação e redução da inflamação. Quando ligada ao seu receptor na célula endotelial, pode ser ativada pelo complexo trombina-trombomodulina, tendo como co-fator de ativação a proteína S (PS). As deficiências da PS estão também associadas a eventos trombóticos (Esmon, 1984). A PC quando ativada exerce suas ações anticoagulantes ao inativar os fatores Va e VIIIa da coagulação, necessitando de seu co-fator, a proteína S, para esta

inativação. Estes fatores Va e VIIIa são essenciais na manutenção do controle positivo (retroalimentação) da coagulação, pois uma vez ativados geram mais fator Xa e conseqüentemente mais trombina. A PCA ao bloquear estes dois fatores impede a geração de trombina, inativando a coagulação em seu evento final: a formação da rede de fibrina. Recém-nascidos com deficiência congênita de PC desenvolvem púrpura fulminante, que pode ser revertida com a suplementação da PC (Esmon, 2001). A proteína C ativada também estimula a fibrinólise através da inibição do inibidor do ativador do plasminogênio e da inibição do inibidor da fibrinólise ativado pela trombina.

Ações antiinflamatórias:

A trombina tem várias ações pró-inflamatórias. Quando a PCA reduz a geração de trombina, indiretamente reduz a inflamação. No entanto a PCA possui atividade antiinflamatória direta. Ao combinar-se com seu receptor na célula endotelial (EPCR), reduz a translocação do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$). A produção de TNF α em monócitos humanos induzida pelo LPS, é inibida pela PCA através da inibição da ativação do NF $\kappa\beta$ e do ativador da proteína-1, *in vitro* (Okajima,2004). A PCA inibe tanto a combinação do NF $\kappa\beta$ aos seus alvos quanto impede a degradação do inibidor kappa β ; ela também inibe a ativação de vias de mitogênicas ativadas por proteinoquinases (Yuksel et al., 2002). A atividade inibitória da PCA pode depender de sua atividade protease-sérica.

A PCA inibe a ativação de neutrófilos através da inibição da produção do TNF α ; esta inibição da ativação de neutrófilos reduziu o dano endotelial, manteve o fluxo sanguíneo gástrico e reduziu as lesões da mucosa gástrica de ratos submetidos a stress por submersão (Isobe et al., 2004). A lesão pulmonar em ratos submetidos a LPS também foi evitada com o uso da PCAr (Hirose et al., 2000). O EPCR é derramado na vasculatura por mediadores

inflamatórios e pela trombina e combina-se a neutrófilos ativados num processo que envolve proteinase 3 e Mac-1 e inibe o extravazamento de leucócitos (Esmon, 2003), reduz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, numa fase bem precoce da cascata inflamatória (Dhainaut et al., 2002). O EPCR pode translocar-se da membrana plasmática endotelial para o núcleo onde redireciona a expressão genética. Na translocação pode carrear a PCA para o núcleo, onde esta irá modular as respostas inflamatórias endoteliais (Esmon, 2003). A PCA melhora diretamente a disfunção endotelial por bloquear as vias sinalizadoras de produção de citocinas, reduzir a expressão das moléculas de adesão, reduzir a permeabilidade vascular e impedir a indução da apoptose (O'Brien et al., 2004). Melhora a resposta adaptativa da parede vascular, protegendo-a de insultos, prolongando a vida da célula endotelial e de outras células teciduais.

A PCA reduz a produção de citocinas inflamatórias mediada pelo LPS, através da inibição da ligação do LPS à molécula CD-14.

Ações anti-adesão celular:

PCA reduz a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais, reduzindo a interação entre elas e os leucócitos, diminuindo o recrutamento de células inflamatórias. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a PCA pode influenciar diretamente as propriedades de adesão das células endoteliais, por suprimir a expressão das moléculas ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, resultando na inibição do contato célula-a-célula (Joyce et al., 2001). O TNF α e outros mediadores inflamatórios fazem uma hipomodulação do EPCR e da TM. A PCA inibe a síntese de TNF α dos monócitos, a produção de TNF α pelo endotélio (White et al., 2000), bloqueia a adesão de leucócitos pelas selectinas (Esmon, 2003), tem papel direto na modulação celular independente de atividade antitrombínica (Grinnell and Joyce, 2001;

Riewald and Ruf, 2005). A aderência de leucócitos ao endotélio de ratos expostos ao LPS teve redução significativa, quando houve injeção simultânea de PCAr em baixas e em altas doses (Iba et al., 2005).

Ações antiapoptóticas:

A PCA ativa vias antiapoptóticas em várias células, inclusive nos linfócitos e enterócitos. A apoptose celular está aumentada com frequência nos pacientes sépticos e contribui para a disfunção múltipla de órgão e sistemas (DMOS) (Dhainaut et al., 2002). Um estudo experimental demonstrou que a PCA aumenta a expressão de genes com ação antiapoptótica, como o BCL-2, IAP, PCNA, supprime a expressão de genes pró-apoptóticos (Calreticulina e TRMP-2) (Joyce et al., 2001) e reduz a transcrição das proteínas p53 e trombospondina-1, também pró-apoptóticas (Riewald and Ruf, 2005).

Ações pró-fibrinolíticas:

A PCA promove a inibição do PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio 1), que envolve a formação de um complexo estável entre este e a PCA (Dhainaut et al., 2003). A inibição do PAI-1 libera a fibrinólise e promove a “desobstrução” microcirculatória. A inibição da geração de trombina pela PCA, indiretamente reduz os níveis do inibidor da fibrinólise ativado por trombina (TAFI), liberando mais esta via da fibrinólise. Dados de estudos *in vitro* sugerem que a PCA inibiria a liberação do PAI-1 da célula endotelial (Dhainaut et al., 2002). Como agente antitrombótico e profibrinolítico tem papel fundamental no fluxo microvascular (Grinnell and Joyce, 2001).

O paciente séptico tem sua homeostase muito alterada, sofrendo um estado de inflamação excessiva e coagulação descontrolada. A terapêutica com a PCA pode ser arma

terapêutica valiosa dados os níveis baixos desta proteína e sua ativação prejudicada nos pacientes com sepse grave. A drotrecogina alfa ativada tem ações amplas e abrangentes e tem representado uma arma poderosa contra os altos índices de mortalidade neste grupo de pacientes.

2. Objetivos

Estudar *in vivo* as ações da Proteína C recombinante humana na microcirculação da janela dorsal do hamster submetido à endotoxemia sem hipotensão, induzida pela injeção venosa de LPS, com a determinação dos diâmetros arteriolar e venular, da densidade capilar funcional e da interação dos leucócitos com o endotélio.

Hipótese: A PCAr é capaz de efetuar recrutamento microcirculatório e reduzir a adesão e rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares em hamsters submetidos à injeção de LPS.

3. Materiais e Métodos

A técnica da janela dorsal em hamsters consiste na colocação de um dispositivo de titânio, com lamínula de vidro em uma janela que, posicionado na pele dorsal do hamster, permite a visualização da microcirculação. O animal é anestesiado com pentobarbital sódico (CEVA- Sanofi Santé Animale), na dose de 50 mg/kg por via intraperitoneal. Após a remoção do pelo da área com creme depilatório e tosquiador, o dispositivo é suturado no dorso do animal contendo duas camadas de pele. A pele de um lado é totalmente removida em uma área circular com cerca de 1,5 cm de diâmetro. A outra camada, constando de uma faixa tênue de músculo estriado e o tecido subcutâneo adjacente, é conservada. Após a colocação da câmara, passa-se um cateter fino de polietileno (0,28 mm de diâmetro interno) na veia jugular direita, através do subcutâneo no lado ventral do pescoço. O cateter é fixado no dispositivo de titânio. O animal tolera bem a colocação da câmara e não foram observadas mudanças no seu comportamento ou no ritmo de sono ou de alimentação, nem desconforto, quando retorna ao seu habitat com a câmara posicionada.

Usamos em nosso estudo hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), machos, com idade entre 6 e 8 semanas e com massa corporal entre 60g e 80g, provenientes do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - CECAL). A pele de animais mais velhos e de maior massa corporal não permite visualização adequada da microcirculação. Os animais foram aclimatados no biotério do Laboratório de Pesquisas em Microcirculação (LPM), Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Centro Biomédico da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), em ambiente com temperatura mantida em $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com ciclo de luz/escuridão de 12h, controlados por temporizador, e acesso irrestrito à água e ração própria para a espécie. Após a instalação da

câmara dorsal os animais foram devolvidos ao biotério em gaiolas individuais, mantendo-se as condições de vida anteriores. O PAMP indutor de sepse foi o LPS (lipopolissacarídeo) de *E.coli* sorotipo 055: B5, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA na dose de 2mg/kg de massa corporal) em “bolus”. Após 7 dias, quando já desapareceram os efeitos do trauma cirúrgico e de anestésico, o animal, sem anestésico, foi imobilizado em um tubo de acrílico com pequenos orifícios laterais para facilitar a respiração. A câmara de titânio passa por uma saída transversal do tubo permitindo a visualização da microcirculação ao microscópio pela janela transparente da preparação. Foi utilizado o microscópio intravital alemão, Leitz–Wetzlar, utilizando-se de transiluminação com lâmpada de tungstênio-halogênio de 100W alimentada por fonte de 12V. Para contraste foram usados filtros azuis (OMEC Corporation 51664 e 59814) para melhor visualização de hemácias circulantes, conforme podemos ver nas figuras 6, 7 e 8.



Figura 6 – Câmara de titânio

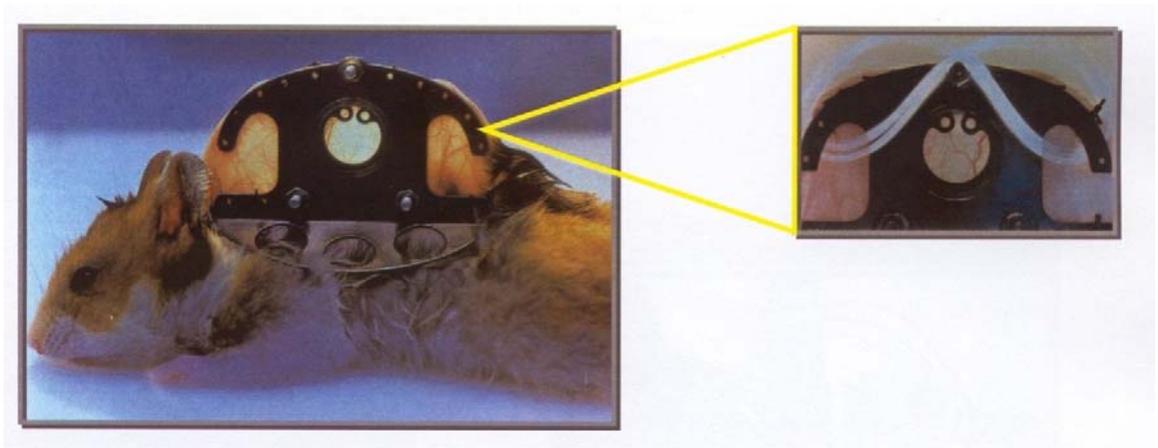


Figura 7- Hamster com câmara de titânio com detalhe da fixação do cateter e câmara

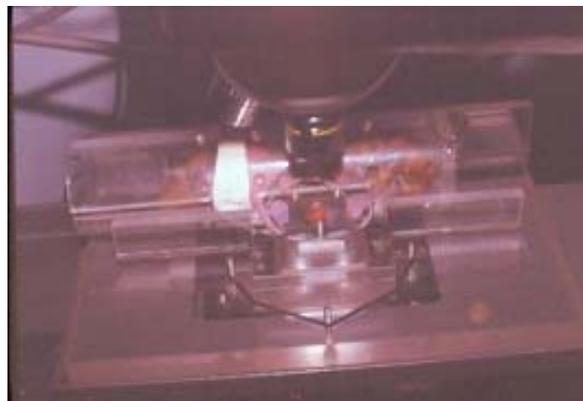


Figura 8 – Animal ao microscópio em tubo de acrílico

O estudo envolveu 5 grupos, cada grupo com 6 animais. Em todos os grupos foram tomadas medidas basais após acomodação do animal ao microscópio por 15 minutos. No grupo controle, as mesmas medidas foram tomadas na 1^a, 3^a, 6^a e 24^a hora. Nos 4 grupos

restantes, após a medidas basais, foi administrado LPS endovenoso na dose de 2mg/kg/massa corporal em “bolus” (hora zero) e realizada a análise das variáveis microcirculatórias nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas após. No 2º grupo, os animais após LPS, tiveram suas variáveis microcirculatórias aferidas sem receber qualquer tratamento. No 3º grupo os animais receberam LPS e após 1 hora iniciou-se a infusão de solução salina isotônica (40 ml/kg/massa corporal infundida em 1 hora), e as medidas foram repetidas. No 4º grupo, 1 hora após o LPS, foi iniciada a infusão de PCAr na dose de 24 µg/kg/hora (0,05 ml/hora) por 5 horas, sendo as variáveis aferidas nos tempos determinados. Para o 5º grupo, iniciou-se ressuscitação volêmica 1 hora após o LPS com 40 ml/kg/massa corporal em 1 hora, seguida da administração de PCAr por 4 horas.

Grupos:

- grupo controle (**GC**) (n=6): sem intervenção, exceto a colocação da câmara de titânio e a canulação da veia jugular direita.
- grupo **LPS** (n=6): administração de LPS na dose de 2 mg/kg de massa corporal.
- grupo **RV** (n=6) : administração de 2 mg/kg de LPS e após 1 hora, infusão de 40 ml/kg de massa corporal de NaCl a 0,9%, durante 1 hora.
- grupo **PCAr** (n=6): administração de LPS na dose de 2 mg/kg; após 1 hora, infusão de PCAr na dose de 24 µg/kg/hora durante 5 horas.
- grupo **RV/PCAr** (n=6): administração de LPS na dose de 2 mg/kg; após 1 hora infusão de NaCl a 0,9% na dose de 40 ml/kg infundidos em 1 hora, seguido da infusão da PCAr na dose de 24 µg/kg/hora durante 4 horas.

Para a visualização da adesão e rolamento de leucócitos foi utilizada a infusão de rodamina na dose de 10 mg/kg IV em “bolus” e observação em microscópio através de filtro verde para transiluminação do núcleo leucocitário marcado e contagem dos leucócitos rolantes e dos aderidos à parede venular, em campo previamente escolhido. A aplicação de rodamina para o impregnação dos leucócitos foi feita nas horas zero, 3, 6 e 24. Na avaliação de 1 hora, a rodamina não havia sido ainda eliminada, não sendo necessária nova aplicação. As análises microcirculatórias foram realizadas com um software (CAPIMAGE versão 6,0, Dr. Zeintl, Heidelberg, Alemanha). O microscópio tem acoplado uma câmara de vídeo (SAMSUNG SBC-320, Coreia) ligada ao monitor de TV (B&W Hitron Systems, Cheonan-Coreia) e a um videocassete (JVC-Victor Company of Japan, Malásia) que nos permitiu a filmagem contínua da microcirculação *in vivo*. Esta imagem foi transmitida a um monitor de TV. As imagens gravadas permitem múltiplas avaliações.

O diâmetro vascular foi aferido pela distância perpendicular entre as paredes do vaso e o cálculo realizado pelo software. A densidade capilar funcional, que é a medida de qualidade de perfusão microvascular, foi definida como o somatório do comprimento de todos os capilares perfundidos em que se via o trânsito das hemácias, por área de observação dada em cm^{-1} , no campo de observação. O somatório dos trajetos de todos os capilares observados com fluxo foi novamente calculado pelo software. Estas imagens foram gravadas da seguinte forma:

-Campo arteriolar: previamente foi escolhido o melhor campo para visualização da arteríola, que foi marcado. Aguardou-se 15 minutos até a acomodação do animal ao microscópio e gravou-se em vídeo por um período de 1 minuto o mesmo campo nos seguintes tempos: zero (em que foi administrado o LPS), 1 hora, 3, 6, 24 horas após a infusão de LPS.

-Campo venular: após a escolha repetiu-se os mesmos procedimentos do campo arteriolar.

-Campo capilar: foram escolhidos 2 campos, após acomodação do animal ao microscópio, contando-se o somatório do comprimento trajeto de capilares funcionantes no campo observado, ou seja, capilares com hemácias circulantes, por unidade de área ($\mu\text{m}/\text{cm}^2$). Foi anotada manualmente a média dos dois campos nos mesmos tempos anteriores.

3.1 Análise estatística

Testes não paramétricos foram utilizados na análise estatística face ao pequeno número amostral e porque os valores obtidos não apresentaram distribuição normal. O teste de Friedman foi aplicado para comparação das variáveis de cada grupo ao longo do tempo (análise longitudinal, intragrupo), com aplicação do teste *post-hoc* de Dunnet para avaliação das diferenças individuais entre os diversos tempos. ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi realizado para as comparações entre os grupos (análise transversal), sendo posteriormente feito o teste *post-hoc* de Dunn para determinação das diferenças individuais nos diversos tempos.

A comparação de frequências dos valores da DCF, dos valores dos leucócitos aderidos ou rolantes foi feita pelo teste do Chi-quadrado para independência.

Para todas as variáveis, foi feita comparação entre os valores encontrados no basal (considerado como valor 1) e os valores encontrados ao longo do tempo; sendo estes últimos considerados de forma percentual, em relação ao basal. Os dados percentuais estão apresentados nos gráficos *boxplot*, sendo assinalados as medianas dos valores, o 1º e o 3º quartis além dos valores extremos.

A sobrevida dos animais nos diversos grupos foi avaliada pelo método Kaplan-Meier.

Foi considerado estatisticamente significativo, todo o efeito cujo nível de significância (p) foi menor que 0,05.

4. Resultados:

O estudo experimental de intervenção randomizado, possibilitou a análise dos dados referentes a: diâmetros arteriolar e venular, densidade capilar funcional, rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular e sobrevida.

4.1 Diâmetro arteriolar:

Os dados do diâmetro arteriolar (μm) estão demonstrados na tabela 1

GRUPOS	Basal	Hora 1	Hora 3	Hora 6	Hora 24
GC	72,5 (65,7-77,7)	77,8 (69,5-79,6)	75,1 (73,0-86,9)	77,8 (71,5-98,1)	80,3 (59,7-84,8)
LPS	72,3 (68,5-84,2)	84,4 (75,6-91,5)	61,5 * (53,2-65,1)	48,0 * (43,8-56,3)	82,8 (48,0-87,1)
RV	82,8 (73,1-93,7)	82,7 (70,5-105,1)	76,2 (59,5-102,3)	73,9 (60,4-104,2)	86,6 (60,7-103,6)
PCAr	101,0 (69,4-118,6)	76,8 (53,8-114,5)	68,3 * (56,1-87,5)	56,5 * (46,3-68,4)	58,3 * (46,8-87,3)
RV/ PCAr	83,7 (55,6-122,8)	87,3 (71,4-95,4)	52,0 * (42,5-60,8)	67,5 * (39,0-76,7)	107,0 (68,8-112,6)

Tabela 1: Variação Diâmetro arteriolar (mediana e quartis)

* $p < 0,05$

Os dados da tabela 1 demonstram que o grupo controle não alterou o diâmetro arteriolar (DA) em relação ao basal nas horas 1, 3, 6 e 24. No grupo LPS, após a infusão da endotoxina, não foi observada mudança no diâmetro arteriolar na 1ª hora; a partir da 3ª hora houve redução do diâmetro para 61,5 (77,7%) na hora 3 e para 48,0 (69,4%) na hora 6, havendo retorno para 82,8 (110,0%) na hora 24. No grupo RV, após a injeção de LPS o diâmetro arteriolar não sofreu qualquer modificação ao longo do tempo, até o final do experimento. No grupo PCAr houve redução no DA para 76,8 (88,8%) na hora 1, para 68,3 (74,7%) na hora 3, para um mínimo de 56,5 (59,9%) na hora 6 e para 58,3 (72,7%) na hora

24. No grupo RV/PCAr houve redução no DA estatisticamente significativa nas hora 3 para 52,0 (60,2%) e para 67,5 (72,7%) na hora 6; houve recuperação para os valores basais, de 107,0 (117,4%) na hora 24.

Em todos os grupos, após a injeção de LPS, houve vasoconstrição arteriolar. No grupo do LPS a vasoconstrição foi significativa em relação ao basal nas horas 3 e 6. Nos grupos PCAr e RV/PCAr, a vasoconstrição se manteve com significância estatística nas horas 3 e 6, apesar das intervenções. No grupo RV/PCAr, na hora 24, o diâmetro arteriolar retornou ao basal. No grupo RV, a infusão rápida de salina evitou a vasoconstrição nas primeiras horas pós-LPS. No grupo PCAr a vasoconstrição se manteve até o final do experimento. A figura 9 abaixo explicita a relação entre o diâmetro arteriolar e o diâmetro arteriolar basal do grupo correspondente nas diversas horas de observação.

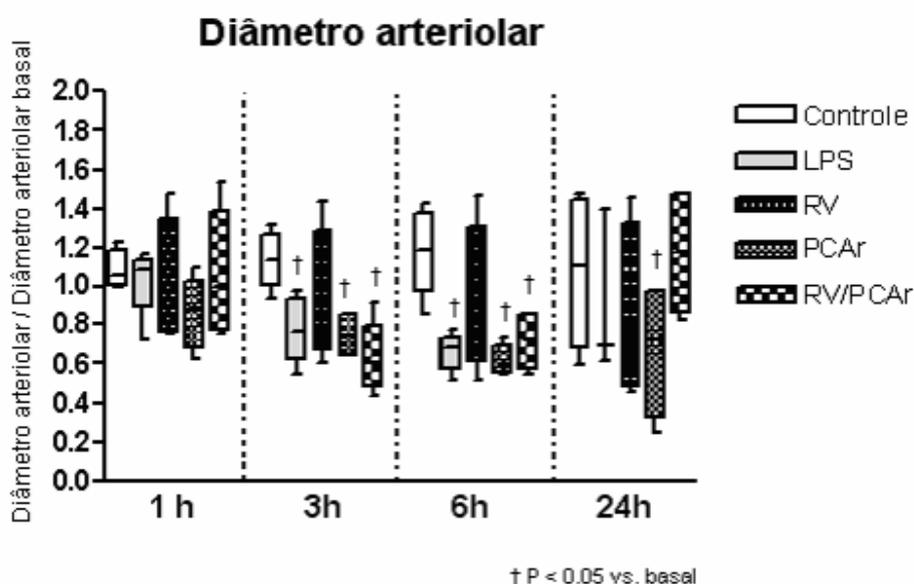


Figura 9

Variação no tempo do diâmetro arteriolar/diâmetro basal nos diversos grupos.

4.2 Diâmetro venular:

Os dados do diâmetro venular (μm) estão demonstrados na tabela 2:

GRUPOS	Basal	Hora 1	Hora 3	Hora 6	Hora 24
GC	99,4 (74,9 -104,6)	99,4 (90,0-105,3)	98,1 (90,7-104,7)	91,2 (80,6-103,0)	86,2 (76,0-92,4)
LPS	121,1 (88,6-132,8)	131,5 * (120,6-138,0)	139,4 * (115,5-161,5)	131,8 * (114,5-186,9)	128,7 * (88,7-150,2)
RV	130,7 (109,9-172,9)	148,6 (121,4-184,5)	155,1 * (128,0-195,4)	153,2 (136,4-176,5)	145,7 (124,1-171,2)
PCAr	107,8 (94,7-164,5)	111,0 (97,8-168,3)	120,1 (104,3-149,0)	115,3 (104,1-139,3)	87,8 * (63,6-124,9)
RV/PCAr	125,3 (101,4-127,5)	120,3 (100,0-153,2)	117,3 (94,5-140,7)	97,9 * (89,7-113,6)	100,5 (62,7-138,6)

Tabela 2: Variação do diâmetro venular (mediana e quartis)

* $p < 0,05$

Os dados do diâmetro venular estão demonstrados na tabela 2. No grupo controle não houve variação nas 24 horas de observação. Após a infusão de LPS, houve pequeno aumento no DV durante todo o tempo de observação, resultado que não se modificou com nenhuma das intervenções.

A figura 10 abaixo explicita a relação entre o diâmetro venular e o diâmetro venular basal do grupo correspondente nas diversas horas de observação.

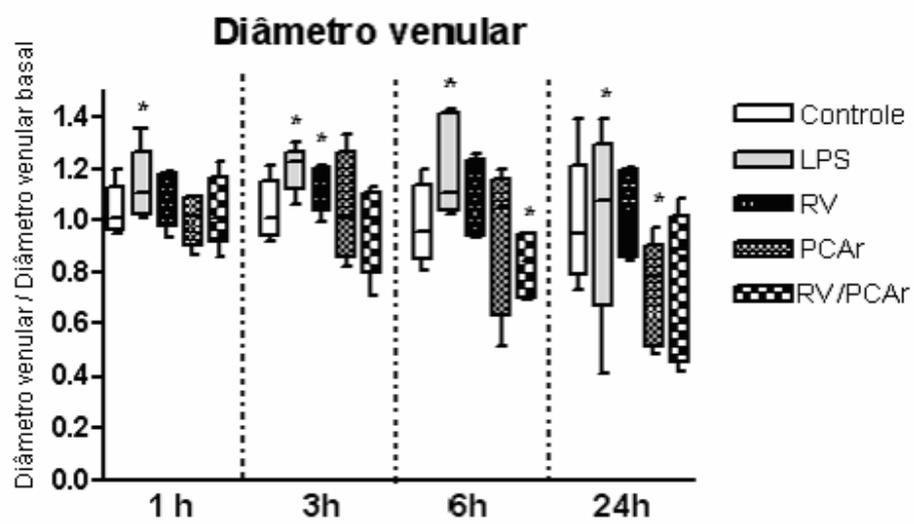


Figura 10

Varição no tempo do diâmetro venular/diâmetro basal nos diversos grupos.

* $p < 0,05$

4.3 Densidade capilar funcional:

Os valores da densidade capilar funcional ($\mu\text{m}/\text{cm}^2$) estão expostos na tabela 3.

Grupos	Basal	Hora 1	Hora 3	Hora 6	Hora 24
GC	118,0 (114,5-122,7)	126,8 (121,3-137,1)	117,9 (115,7-122,2)	118,5 (117,3-119,4)	121,5 (118,1-123,6)
LPS	129,5 (124,1-135,5)	64,4 * (52,5-77,6)	0,0 * (0,0-54,5)	6,2 * (0,0-33,4)	21,9 * (21,6-32,3)
RV	120,6 (105,0-134,4)	39,0 * (0,0-64,6)	50,5 * (26,6-70,1)	46,9 * (24,8-57,2)	76,0 (61,7-90,9)
PCAr	141,5 (136,0-156,0)	56,5 * (0,0-108,0)	35,0 * (12,0-56,0)	39,0 * (20,0-54,0)	52,5 * (13,0-63,0)
RV/PCAr	161,6 (140,4-177,2)	79,8 * (36,4-121,0)	90,6 * (86,5-109,2)	86,3 * (81,4-106,5)	151,4 (151,4-151,4)

Tabela 3 : Densidade Capilar Funcional (mediana e quartis)

nos diferentes grupos. * $p < 0,05$

A avaliação longitudinal intra-grupo controle demonstrou que não houve diferença estatística, ao longo do tempo, no grupo sem intervenção. No grupo LPS, após 1 hora da infusão de 2 mg/kg de endotoxina, houve queda de 129,5 μm (124,1-135,5) no basal para 64,4 μm (52,5-77,6), isto é, queda para 49,1% em relação ao basal. A queda foi progressiva com mínimo de 0,0 μm (0,0-54,5) após 3 horas da injeção do LPS, mantendo-se baixa com valores de 6,2 μm (4,6%) e 21,9 μm (17,7%) nas horas 6 e 24. Em todos os grupos, após o LPS, houve redução importante na DCF estatisticamente significativa em relação ao basal.

No grupo RV, a DCF também reduziu de forma significativa após 1 hora da infusão do LPS para 39,0 μm , ou seja para 30,9% em relação ao basal. Permaneceu baixa, porém com tendência a recuperação, na 3ª hora e na 6ª hora, com valores de 50,5 μm e 46,9 μm respectivamente, mantendo diferença estatística significativa em relação ao basal. A avaliação após 24 horas mostrou recuperação para 76,0 μm , resultado estatisticamente semelhante ao basal.

O grupo PCAr, após a administração de LPS houve queda para 56,5 μm (35,1%) na DCF, na avaliação de 1 hora. A infusão de PCAr iniciada 1 hora após o LPS, não demonstrou efeito na recuperação da DCF na hora 3 (o grupo recebia PCAr por 2 horas) nem na hora 6 (o grupo recebia PCAr já por 5 horas). A redução na DCF continuou importante e diferente em relação ao basal: 35,0 μm (22,6%), 39,0 μm (28,4%) e 52,5 μm (36,5%) nas horas 3, 6 e 24 respectivamente.

O grupo RV/PCAr teve queda na DCF, após 1 hora da infusão de LPS, para 79,8 μm que significou queda para 43,1% em relação ao basal. Na hora 3 a DCF recuperou-se para 90,6 (65,1%) e na hora 6 a DCF estava com 86,3 μm (54,1%) funcionando, porém diferenças ainda significantes em relação ao basal. Na hora 24 a microcirculação encontrava-se com funcionamento de 151,4 μm (73,9%), resultado estatisticamente semelhante ao basal.

Após a infusão do LPS houve redução da DCF em todos os grupos. No grupo do LPS sem qualquer intervenção, o fluxo parou completamente na avaliação da 3ª hora e manteve-se baixo (<17,7% do basal) durante todo o experimento. Nos grupos de RV e PCAr houve também queda na hora 3 para um mínimo de 50,5 μm (18,4%) e 35,0 μm (22,6%) respectivamente, com recuperação para 76,0 μm (35,1%) e 52,5 μm (36,5 %) na avaliação

de 24 horas. O grupo RV/PCAr, em que foram feitas 2 intervenções conjugadas, houve queda da DCF na 1ª hora de 161,6 µm no basal para 79,8µm (43%), porém houve recuperação precoce para 90,6 µm (65,1%) em relação ao basal na 3ª hora; a melhora foi gradativa com recuperação até 151,4 µm (73,9%), sendo semelhante ao valor basal com 24 horas.

A figura 11 abaixo mostra a relação entre a DCF e a DCF basal do grupo correspondente nas diversas horas de observação.

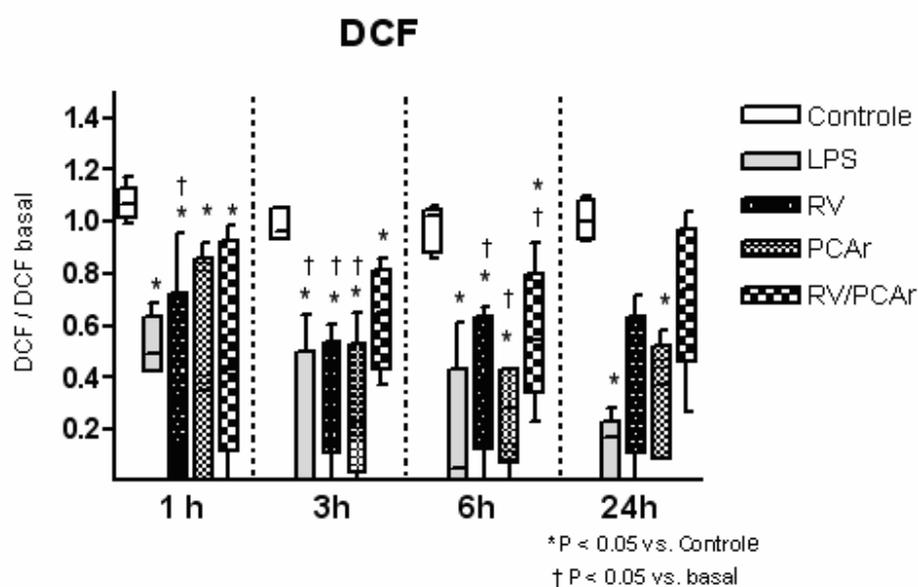


Figura 11

Varição no tempo da DCF / DCF basal nos diversos grupos.

* p<0,05

4.4 Adesão de leucócitos

O número de leucócitos aderidos ao endotélio por cm^2 nos diferentes grupos, ao longo do tempo, são mostrados na tabela 4.

Grupos	Basal	Hora 1	Hora 3	Hora 6	Hora 24
GC	1,0 (0,0-6,0)	1,5 (0,0-4,0)	2,0 (1,0-2,0)	2,5 (2,0-3,0)	1,5 (0,0-2,0)
LPS	2,0 (0,0-2,0)	2,5 (2,0-4,0)	8,0 (0,0-18,0)	26,0 (14,0-31,0)	38,5 * (31,0-51,5)
RV	0,0 (0,0-1,0)	3,5 (2,0-5,0)	8,5 (8,0-31,0)	7,5 (4,0-10,0)	23,0 * (21,0-30,0)
PCAr	2,0 (1,0-3,0)	7,0 (1,0-12,0)	9,5 (5,0-13,0)	16,5 * (12,0-18,0)	10,0 (9,0-15,0)
RV/PCAr	1,5 (1,0-5,0)	4,5 (1,0-6,0)	9,5 (5,0-12,0)	16,0 * (12,0-20,0)	9,5 (6,0-21,0)

Tabela 4 : Adesão de leucócitos por cm^2 (mediana e quartis) nos diferentes grupos.

* $p < 0,05$

Conforme a tabela 4, não foram observadas alterações na adesão dos leucócitos ao endotélio ao longo do tempo no grupo sem intervenção (controle). Após a administração do LPS houve aumento gradativo do número de leucócitos aderidos ao longo do tempo. A diferença em relação ao basal no grupo LPS teve significância estatística na hora 24. A mediana dos valores encontrados foram 2,0; 2,5; 8,0; 26,0 e 38,5 nas horas 1, 3, 6 e 24, respectivamente.

O grupo RV sofreu aumento gradativo do número de leucócitos aderidos até a hora 24, quando este valor tornou-se significativamente diferente do basal. Os valores foram: basal 0,0 (0,0-1,0), 1ª hora 3,5 (2,0-5,0); 3ª hora 8,5 (8,0-31); 6ª hora 7,5 (4,0-10,0); 24ª hora 23,0 (21,0-30,0). O valor da 24ª foi estatisticamente diferente do basal.

No grupo PCAr, após a infusão de LPS, houve aumento gradativo do número de leucócitos aderidos do basal de 2,0 (1,0-3,0) para 7,0 (1,0-12,0) na 1ª hora, para 9,5 (5,0-13,0) na 3ª hora, para 16,5 (12,0-18,0) na 6ª hora; na 6ª hora o valor teve diferença em relação ao basal. Houve redução na adesão para 10,0 leucócitos (9,0-15,0) na 24ª hora, valor estatisticamente semelhante ao basal. O grupo RV/PCAr teve também adesão crescente de um basal de 1,5 (1,0-5,0), para 4,5 (1,0-6,0) na 1ª hora, 9,5 (5,0-12,0) na 3ª hora, para 16,0 (12,0-20,0) na 6ª hora. A avaliação de 24 horas mostrou queda para 9,5 (6,0-21,0) de leucócitos aderidos, voltando o grupo a ficar semelhante ao basal.

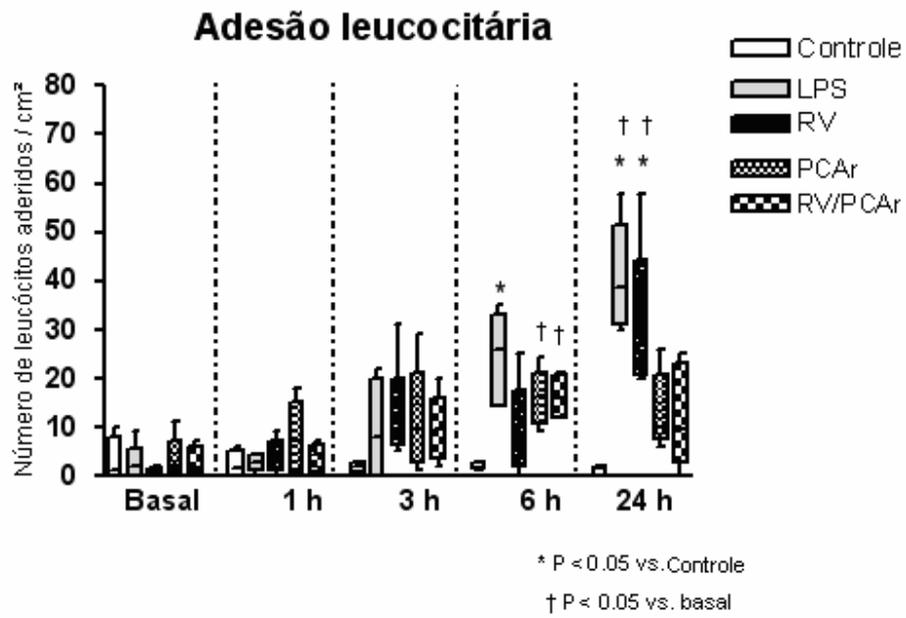


Figura 12
 Variação no número de leucócitos aderidos por cm² nos diversos grupos.

4.5 Rolamento de leucócitos

A tabela 5 mostra o número de leucócitos rolantes por cm² de observação, nos diferentes grupos ao longo do tempo.

Grupos	Basal	Hora 1	Hora 3	Hora 6	Hora 24
GC	45,0 (16,0-53,0)	28,0 (15,0-87,0)	35,0 (26,0-64,0)	46,0 (26,0-77,0)	26,0 (18,0-40,0)
LPS	11,0 (7,0-12,0)	8,0 (4,0-9,0)	13,0 (7,0-14,0)	17,0 (13,0-26,0)	11,0 (4,0-25,5)
RV	23,0 (2,0-73,0)	4,0 (0,0-15,0)	12,0 (5,0-25,0)	17,0 (2,0-20,0)	22,0 (15,0-28,0)
PCAr	12,5 (7,0-23,0)	11,5 (0,0-14,0)	11,0 (9,0-16,0)	17,0 (10,0-26,0)	24,5 (9,0-36,0)
RV/PCAr	2,0 (0,0-4,0)	2,0 (0,0-9,0)	7,0 (1,0-9,0)	10,0 (7,0-17,0)	66,0 (17,0-117,0)

Tabela 5 : Rolamento de leucócitos (mediana e quartis) nos diferentes grupos

A mediana dos valores dos leucócitos rolantes do grupo sem intervenção (controle) não demonstrou diferença intragrupo ao longo do tempo. No grupo LPS, 1 hora após a infusão da endotoxina, a mediana dos valores demonstrou pequena queda de 11,0 (basal) para 8,0 nos leucócitos rolantes. Porém ao longo do tempo 3, 6 e 24 horas, os valores foram 13,0 , 17,0 e 11,0, sem diferença estatística. No grupo RV a mediana da contagem basal de

leucócitos rolantes foi 23,0 (2,0-73,0). Após 1 hora da infusão de LPS, este número caiu para 4,0 (0-15,0) e após houve aumento para 12,0 (5,0-25,0) na hora 3, 17,0 (2,0-20,0) na hora 6 e 22,0 (15,0-28,0) na hora 24. Os valores encontrados no grupo PCAr foram 12,5 (7,0-23,0) no basal; 11,5 (0,0-14,0) na hora 1; 11,0 (9,0-16,0) na hora 3; 17,0 (10,0-26,0) na hora 6; 24,5 (9,0-36,0) na hora 24. Os valores para o grupo RV/PCAr foram 2,0 (0,0-4,0) no basal; 2,0 (0,0-9,0) na hora 1; 7,0 (1,0-9,0) na hora 3; 10,0 (7,0-17,0) na hora 6; e na hora 24 foram 66,0 (17,0-117,0).

Na avaliação intergrupo houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o basal do grupo RV/PCAr, entre o controle e o grupo RV/PCAr na contagem das horas 6 e 24. Não houve diferença estatística inter-grupos em outros momentos do experimento quanto ao rolamento de leucócitos.

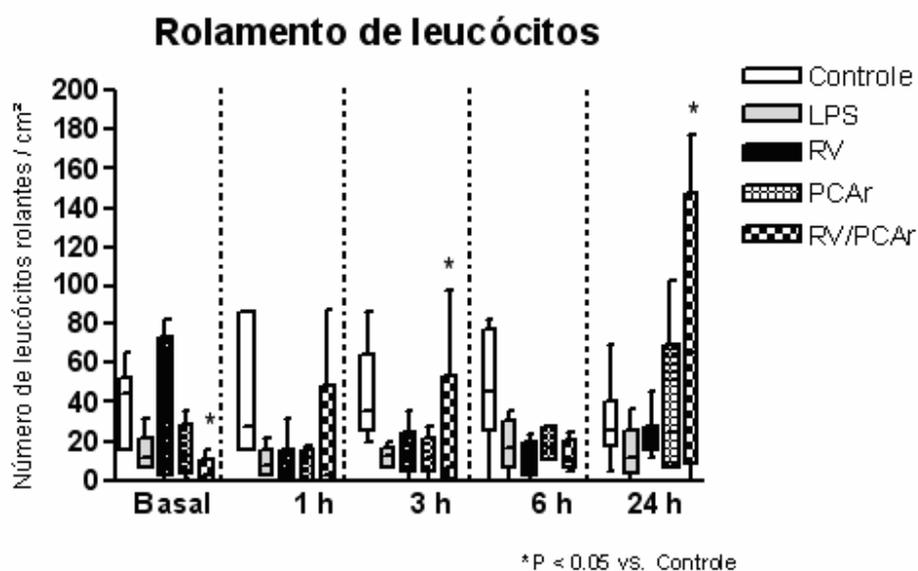


Figura 13 – Variação do número de leucócitos rolantes nos diferentes grupos.

4.6 Análise de sobrevida

Grupos	Mediana	Média	Desvio padrão	Fatalidades	Sobreviventes	Nº Total
LPS	2,0	2,2	1,2	6	0	6
RV	6,0	5,7	1,5	3	3	6
PCAr	7,0	5,4	2,7	1	5	6
RV/PCAr	6,5	5,7	2,0	3	3	6
Total	5,0	4,8	2,4	14	11	24

Tabela 6 : Sobrevida em dias nos diferentes grupos.

A análise da sobrevida demonstrou que todos os animais no grupo controle necessitaram ser sacrificados aos 7 dias e que todos os do grupo LPS morreram em no máximo 4 dias (mediana de sobrevida foi de 2,2 dias). Em todos os grupos de intervenção houve aumento considerável da sobrevida: 5,7 dias no grupo RV (3 sacrificados), 5,4 dias no grupo PCAr (4 sacrificados) e 5,7 dias no grupo RV/PCAr (com 3 sacrificados).

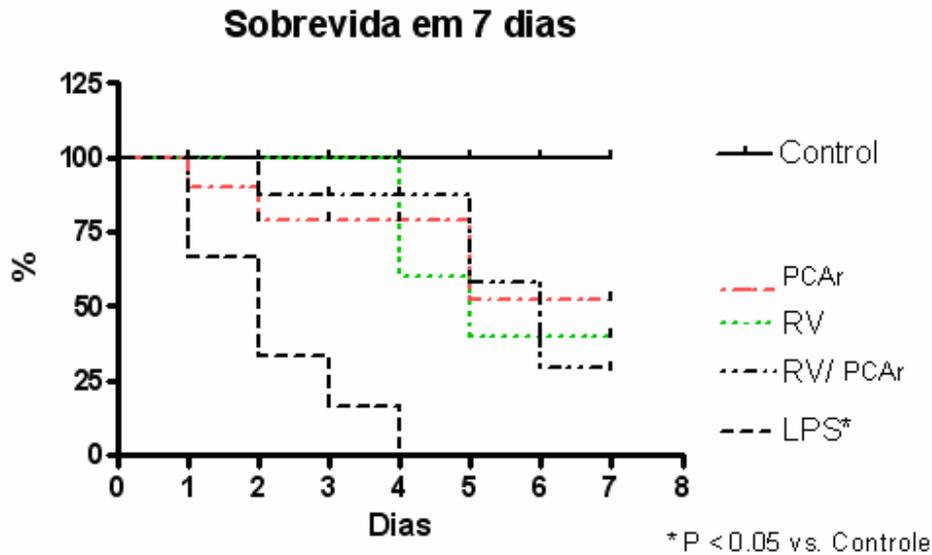


Figura 14- Curva de sobrevida proporcional (Kaplan-Meier)

5. Discussão:

A microcirculação é reconhecida hoje como o cenário de lutas entre agentes infecciosos e seus produtos e as células de defesa do organismo e seus mediadores. Neste cenário, o endotélio tem papel de protagonista. Disfunção microcirculatoria e endotelial multiorgânicas, se não revertidas, contribuem para morbidade e mortalidade de pacientes com endotoxemia, choque e choque séptico (Sakr et al., 2004). A abordagem da sepse tem caminhado de um foco na macrohemodinâmica para um olhar cuidadoso da microhemodinâmica. A recuperação da pressão arterial e do débito cardíaco muitas vezes não melhora a função microvascular, sendo a ressuscitação microcirculatoria uma meta terapêutica atual (Bateman and Walley, 2005).

Muito se caminhou na compreensão dos eventos sépticos, porém esta compreensão não se acompanhou da descobertas de medidas que pudessem restaurar a microcirculação. Pacientes com sepse grave freqüentemente necessitam de reposição rápida de líquidos, o que é essencial para restaurar o débito cardíaco e a pressão arterial. A hipovolemia na sepse pode ser absoluta, por perdas líquidas ocasionadas pelo extravasamento vascular; pode ser relativa, decorrente do aumento da capacidade vascular pela vasodilatação, em que o volume intravascular é normal. O aumento da capacitância venosa pode ser devido à liberação de mediadores inflamatórios ou efeito colateral de drogas. A reposição volêmica melhora a perfusão de órgãos vitais e tecidos otimizando o fornecimento de oxigênio (Rivers et al., 2008). A rápida restauração da deficiência de fluidos na sepse, não apenas modula a inflamação, mas também reduz a necessidade de terapia vasopressora, do uso de corticóides e a conseqüente necessidade de monitorização invasiva (Rivers et al., 2008). A terapia de ressuscitação volêmica orientada por metas mostrou melhora na modulação da resposta inflamatória, redução dos marcadores de coagulação e inflamação, redução da necessidade de suporte cardiovascular, incluindo necessidade de ventilação mecânica e de cateter de artéria pulmonar nos pacientes tratados com objetivos terapêuticos, quando comparados aos que receberam tratamento padrão (Rivers et al., 2001).

Como acontece nos acidentes vasculares isquêmicos e no infarto agudo do miocárdio, a sepse tem também suas horas de ouro, que representam uma janela de tempo precoce no curso da doença, para a oportunidade de ressuscitação vigorosa da microcirculação. Esta janela, de cerca de 6 horas, tem grande impacto no desfecho da doença (Rivers et al., 2005). Estudos clínicos têm demonstrado que a melhora da perfusão microvascular é associada a um melhor prognóstico. Para avaliarmos medidas diretas da microcirculação após indução

de endotoxemia e as modificações secundárias às intervenções de ressuscitação com fluidos e com proteína C ativada, escolhemos o modelo da janela dorsal em hamsters.

5.1 Considerações metodológicas

O modelo de observação da microcirculação através da câmara dorsal em hamsters foi desenvolvido por Endrich e colaboradores e publicado em 1980, e é usado há mais de 20 anos. Este modelo permite a observação por tempo prolongado da microcirculação *in vivo*, com o animal sem ação de anestésicos, cujos efeitos poderiam alterar as avaliações. Diversos trabalhos de Hoffmann e colaboradores, utilizando a infusão de LPS como modelo de sepse e a observação da microcirculação através da janela dorsal, comprovam a utilidade desse modelo (Hoffmann et al., 1999; Hoffmann et al., 2000; Hoffmann et al., 2002). O LPS representa o componente biologicamente ativo da endotoxina; sua infusão venosa em animais causa sintomas semelhantes à sepse em humanos, como taquicardia, taquipnéia e hipertermia (Remick et al., 2000) e induz a liberação de citocinas inflamatórias de forma semelhante (Michie et al., 1988; Remick et al., 1990). A administração de LPS, como modelo de sepse, ratifica o conhecimento de que a resposta do hospedeiro é que causa o quadro clínico e não o patógeno isoladamente (Rittirsch et al., 2007).

Muito do conhecimento das alterações microvasculares na sepse, da ação de substâncias como corticóides, albumina, antitrombina III, vitamina C, antiinflamatórios, dentre outras, na microcirculação adoecida pela sepse, além dos efeitos de várias substâncias que alteram a reatividade vascular, resulta de pesquisa neste modelo de indução de endotoxemia pela infusão de LPS (Baker et al., 1990; Baker et al., 1994; Woodman et al., 2000; Anning et al., 2004; Yipp et al., 2002; Lehmann et al., 2006; Schäper et al., 2007;).

Usamos a dose de LPS de 2 mg/kg de massa corpórea para a obtenção de endotoxemia sem hipotensão (Hoffmann et al., 2002; Schäper et al., 2007).

Utilizamos o modelo da câmara dorsal por permitir a avaliação seqüencial de intervenções e seus resultados, de forma prolongada, possibilitando a gravação das imagens vistas no microscópio, tornando possível novas verificações. Nosso grupo controle demonstrou que a microcirculação permanece funcionalmente normal após a colocação da câmara e da cateterização da veia jugular do animal por, pelo menos, 7 dias. A aplicação de LPS alterou de forma significativa as variáveis microcirculatórias analisadas, ocasionando constrição arteriolar, importante redução na DCF, aumento da adesão de leucócitos e morte precoce dos animais, como já visto em outros estudos.

Há muitas semelhanças entre a injeção de LPS e a sepse, inclusive nas alterações fisiopatológicas (Remick and Ward, 2005). Outro modelo de sepse é o da ligadura e rutura do ceco em roedores. Por se tratar de um modelo em que a sepse ocorre de forma gradual e os danos vasculares e orgânicos são estabelecidos também gradualmente, com a elevação mais lenta das citocinas inflamatórias, o modelo de rutura do ceco vem se tornando uma alternativa razoável por mimetizar melhor a sepse humana. No modelo de LPS, as doses são altas e administradas em “bolus”, ocasionando aumento muito maior e transitório de citocinas (Koike et al., 2003). Em relação à morbidade, às alterações hematológicas como leucometria e contagem de linfócitos e à mortalidade, os modelos são similares (Remick and Ward, 2005). Em relação ao perfil e quantidade de citocinas inflamatórias liberadas, os modelos diferem bastante (Villa et al., 1995; Koike et al., 2003; Remick and Ward, 2005; Rittirsch et al., 2007). Esmon, em 2004, resumiu as possíveis causas que podem explicar porque, intervenções benéficas em modelos animais de sepse, não produzem os mesmos resultados em humanos. Dentre as causas estão as doses administradas de bactérias ou seus

produtos; algumas drogas são de espécie diferente (a PCAr ou a AT III), cuja resposta em outra espécie pode ser reduzida; a falta de correlação entre a idade animal do modelo e a idade do paciente humano, a que a droga é destinada; a maior resistência animal a certos produtos bacterianos, como ao LPS, pela exposição permanente do animal a um meio muito contaminado; o tempo da intervenção terapêutica no humano pode corresponder a um tempo de sepse diferente do modelo, com perfil de citocinas diferente; e o fato de a sepse humana ocorrer muitas vezes em organismos com comorbidades; o diabetes e a aterosclerose, por exemplo, são condições clínicas que alteram a regulação da atividade da trombosmodulina e a expressão do receptor endotelial da PC (Esmon, 2004).

Todos estes questionamentos alertam para a dificuldade de transposição completa dos achados e resultados dos modelos de sepse animal para a humana, porém estes modelos são ainda uma ferramenta de grande utilidade para a ampliação de nosso conhecimento sobre esta patologia multifacetada, de complexa regulação e muito difícil intervenção.

5.2 Discussão dos resultados

Bacteremia por *E. coli* conduziu à vasoconstrição das arteríolas intestinais com hipoperfusão, em um estudo com ratos, realizado por Krysztopik e colaboradores em 1997. Schmidt e colaboradores em 1996, estudando as ações da dopexamina no fluxo sanguíneo das vilosidades intestinais durante endotoxemia em ratos, observaram que a aplicação de LPS (1,5 mg/kg de massa corporal) também ocasionou redução no diâmetro arteriolar e no fluxo sanguíneo das vilosidades. Outro estudo, realizado por Spain e colaboradores (1990), também demonstrou que a aplicação de *Escherichia coli* venosa causou constrição da

arteríola do intestino delgado de ratos, com conseqüente hipoperfusão. Schumacher e colaboradores em 2001, estudando as alterações microcirculatórias na musculatura esquelética de ratos sob endotoxemia, demonstraram que os anestésicos voláteis isoflurano, enflurano e halotano perderam a capacidade de ação vasodilatadora sobre as arteríolas, quando estas estavam sob a ação da endotoxina.

O estudo de Hoffmann e colaboradores em 2004 utilizou modelo semelhante de observação da microcirculação, através da câmara dorsal em hamsters, após injeção de 2 mg/kg de LPS. Em seu trabalho, no entanto, utilizou concentrado de proteína C ativada de plasma humano e não a sua forma recombinante, iniciando sua infusão 5 minutos antes da injeção de LPS. Eles observaram que o diâmetro arteriolar não se alterou após o LPS num período de 24 horas, porém, o tratamento prévio com PCA reduziu de forma significativa o DA, quando comparado com o valor basal.

Em nosso estudo, a observação da arteríola após a infusão de LPS demonstrou redução no seu diâmetro, que foi mais marcante a partir da hora 3, em todos os grupos analisados, exceto no grupo RV, em que a ressuscitação volêmica manteve o DA inalterado até o final das 24 horas de observação. A redução do DA após LPS em todos os grupos, pode responder, pelo menos parcialmente, pela redução na DCF observada. Nos experimentos houve constrição arteriolar nos grupos LPS, PCAr, RV/PCAr. No grupo LPS, sem qualquer intervenção terapêutica, o diâmetro continuou reduzido até o final do experimento (redução para 70,1% do basal).

A constrição arteriolar imprópria pode ser responsável pela manutenção do fluxo microcirculatório baixo, explicando porque alguns pacientes com sepse grave e choque séptico respondem à terapia vasodilatadora, com melhora de parâmetros de avaliação

indireta da microcirculação (Trzeciak and Rivers, 2005). O comportamento do choque séptico na criança é diferente do adulto, com maior frequência de alta resistência vascular sistêmica e de disfunção miocárdica. A vasoconstrição, ou seja, a ausência da vasodilatação arteriolar esperada nas sepSES graves, pode ser apenas a resposta inicial ao LPS; conjecturamos se o estímulo séptico fosse mantido e não apenas uma injeção única de LPS, se ocorreria vasodilatação arteriolar numa etapa posterior. Outra possibilidade é se um endotélio muito jovem, como o da criança ou do hamster de poucas semanas, teria uma capacidade limitada de produção de NO, não havendo possibilidade de vasodilatação significativa.

As alterações no DV em nosso estudo foram sutis, com pequeno aumento após injeção de LPS, mantido mesmo com as intervenções realizadas. O comportamento do DV nos experimentos foi “anárquico”, “caótico”, sem apontar para qualquer causa. O trabalho de Hoffmann e colaboradores (2004), utilizando modelo semelhante, também encontrou pequeno aumento no diâmetro venular após LPS, e no grupo de pré-tratamento com PCA o diâmetro venular não se alterou.

O aumento da interação leucócito-endotélio e a redução da perfusão da rede capilar são mecanismos chaves para a disfunção orgânica na sepse (Hoffmann et al., 2002). O LPS induz maior rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio de roedores (Davenpeck et al., 1998; Yipp et al., 2002; Anning et al., 2004). O uso de ressuscitação volêmica reduziu a adesão e rolamento de leucócitos induzidos pelo LPS num estudo de Anning e colaboradores (2004). Já Hoffmann e colaboradores, em 2002, observaram redução na adesão de leucócitos ao endotélio arteriolar e venular de hamsters submetidos a LPS, quando a RV foi realizada com hidroxietilamido, mas não com solução salina isotônica. Yan e colaboradores, 2002, sugerem que a expressão de moléculas de adesão, após indução de

endotoxemia por LPS, não é uniforme para todos os órgãos observados, podendo diferir em grau dependendo do tecido analisado. O aumento da interação entre os leucócitos e as células endoteliais com redução da perfusão capilar representa um mecanismo chave na disfunção orgânica (Hoffmann et al., 2002). A alteração da interação leucócito-endotélio, com maior adesão de polimorfonucleares às células endoteliais, são eventos importantes na resposta inflamatória, exercendo papel fundamental na patogênese da sepse, contribuindo para a agressão vascular, tecidual e para a disfunção multiorgânica (Egan et al., 2001; Iba et al., 2005).

Estudos demonstram o importante papel da PCA na redução de marcadores de inflamação, como o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio (Hoffmann et al., 2004; Iba et al., 2005; Lehmann et al., 2006; Lehmann et al., 2008). O rolamento de leucócitos é mediado principalmente por moléculas de adesão da família das selectinas; a redução do rolamento promovida pela PCA sugere que a droga faça modulação destas moléculas na endotoxemia animal (Hoffmann et al., 2004).

Em relação ao rolamento de leucócitos, nosso estudo mostrou, no grupo LPS, leve aumento do número de leucócitos rolantes entre as horas 3 e 6, sem diferença estatística em relação ao basal. A injeção de LPS tornou o fluxo venular muito lento, havendo poucos leucócitos se movendo na vênula, portanto não havendo fluxo para conduzir leucócitos. Nos grupos RV e RV/PCAr, relacionamos o aumento marcante dos leucócitos rolantes nos tempos 6 e 24 horas, à melhora do fluxo microcirculatório, antes praticamente paralizado. Já no trabalho de Hoffmann e colaboradores (2004), o LPS conduziu a um aumento dos leucócitos rolantes, principalmente após 8 horas da injeção de LPS e o pré-tratamento com PCA, ao contrário, reduziu o fenômeno do rolamento.

Em nosso estudo o LPS causou marcante aumento da adesão de leucócitos ao endotélio ao longo do tempo, com diferença significativa em relação ao basal após 6 horas da injeção de LPS. Houve redução da adesão de leucócitos ao endotélio na avaliação de 24 horas nos 2 grupos que receberam a PCAr.

Trabalhos anteriores confirmam a marcante heterogeneidade do fluxo microvascular, caracterizada por grande número de capilares sem fluxo vizinhos a capilares bem perfundidos (De Backer et al., 2002; Bateman et al., 2003). Usando o modelo de microscopia intravital após indução de sepse animal, Ellis e colaboradores, em 2002, demonstraram que num mesmo campo havia a presença de capilares com alto fluxo, capilares com baixo fluxo e capilares sem fluxo. A distribuição alterada de fluxo capilar justifica a má distribuição de oxigênio. Pode haver uma irresponsividade aos estímulos vasomotores ou mesmo oclusão capilar fixa por coágulo (Ellis et al., 2005).

A via da PCA faz interface entre o endotélio e a resposta leucocitária do sistema imune inato. Possui propriedades profibrinolíticas, antiinflamatórias e antiapoptóticas, atuando como modulador microvascular e endotelial, opondo-se à ação da trombina e das citocinas pró-inflamatórias. A infusão de PCA reduz a resposta inflamatória, como evidenciado pela medida da aderência leucocitária ao endotélio sob estímulo séptico. Trabalhos prévios já demonstraram que a PCA pode não alterar os parâmetros macrocirculatórios, mas promove a melhora da perfusão microvascular, demonstrada pela recuperação da DCF, tem efeitos antiinflamatórios, demonstrados pela redução na adesão de leucócitos ao endotélio das vênulas pós-capilares, atenuando a respostas inflamatórias induzidas pelo LPS (Hoffmann et al., 2004; Iba et al., 2005).

A administração da PCA durante endotoxemia experimental, num trabalho de Lehmann e colaboradores em 2006, melhorou a microcirculação intestinal de ratos,

mantendo a DCF, reduzindo a adesão de leucócitos ao endotélio das veias submucosas. Os efeitos microcirculatórios da PCA podem ser devidos à redução na liberação de IL-1 (Lehmann et al., 2008). O trabalho de Lehmann e colaboradores, em 2006, realizado para avaliar as ações da PCA em endotoxemia experimental, aferindo citocinas inflamatórias e variáveis microhemodinâmicas e da macrocirculação, demonstrou que a PCA não alterou os parâmetros macrohemodinâmicos, mas promoveu um aumento significativo da densidade capilar funcional da mucosa e da musculatura intestinal dos animais. Hoffmann e colaboradores (2002), estudando a microcirculação por microscopia intravital, observaram que a solução salina isotônica não melhorou a densidade capilar funcional na observação pela janela dorsal em hamsters, durante endotoxemia não hipotensiva; já o uso de hidroxietilamido (130 kD) neste experimento melhorou a DCF de forma significativa. Hoffmann e colaboradores (2004), novamente usando janela dorsal em endotoxemia, demonstraram melhora na DCF quando os hamsters foram pré-tratados com PCA, demonstrando melhora na perfusão microvascular nutritiva, particularmente após 24 horas. Neste trabalho Hoffmann iniciou o tratamento com PCA 5 minutos antes da aplicação do LPS e utilizou concentrado de PCA preparado com plasma humano.

No nosso estudo, utilizamos a PCA recombinante humana, que segundo Hoffmann e colaboradores, (2004), tem meia vida mais curta que a PCA retirada do plasma humano e que as diferenças entre as espécies provavelmente não têm importância maior nos resultados. Nossos resultados mostram que a DCF foi recuperada com resultado estatisticamente semelhante ao basal nos 2 grupos que receberam ressuscitação volêmica. Ao contrário do trabalho de Hoffmann e colaboradores, em 2002, o uso da RV melhorou a DCF. A recuperação foi maior no grupo RV/PCAr (tratamento combinado), mostrando que ressuscitação volêmica e PCAr tiveram ações aditivas na restauração microcirculatória. A

administração isolada de PCAr não melhorou de forma significativa a DCF, resultado diferente do trabalho de Hoffmann e colaboradores em 2004, onde foi utilizada a PCA de plasma humano aplicada antes injeção do LPS.

A complicação mais temida da infusão da PCAr na sepse é o sangramento anormal, principalmente cerebral. Os animais que receberam a PCAr, ao serem sacrificados, demonstravam comportamento semelhante aos do grupo controle. Em nosso estudo, os animais tratados com PCAr não tiveram sinais de sangramento, mesmo nos locais das suturas dos procedimentos cirúrgicos prévios para colocação da câmara e do cateter venoso.

Em nosso estudo os animais submetidos ao LPS e posteriormente tratados com a PCAr isoladamente ou em combinação com RV viveram mais. A curva de sobrevivência demonstra que quaisquer das duas intervenções melhorou a sobrevida, coincidindo com a recuperação do número de capilares com fluxo restabelecido (recuperação da DCF). Como afirmaram Bateman e Walley em 2005, a disfunção microvascular melhora rapidamente nos sobreviventes e não melhora nos não-sobreviventes. Os animais que sobreviveram mais do que 7 dias foram sacrificados.

Além destas, que outras ações antiinflamatórias ou ações diretas e indiretas nas interações celulares e no controle do tônus vascular terá a proteína C ativada, é questão ainda não respondida.

6. Conclusão:

A via da proteína C da coagulação integra um sistema de controle de inflamação e de trombose, com efeitos citoprotetores, principalmente para o endotélio. A proteína C ativada recombinante humana é a primeira droga antiinflamatória aprovada para o tratamento da sepse grave nos Estados Unidos da América. Os mecanismos que estão por trás de suas ações não são completamente compreendidos. Nosso estudo demonstrou que, em situações de endotoxemia animal não-hipotensiva, a PCAr reduziu a adesão de leucócitos ao endotélio e aumentou de forma significativa a função microcirculatória, evidenciada pelo aumento da densidade capilar funcional, com efeitos de melhora aditivos à ressuscitação volêmica. De forma considerável aumentou a sobrevivência dos animais tratados. A PCAr não reduziu o número de leucócitos rolantes nem alterou os diâmetros arteriolar ou venular após o LPS. Não houve nenhum sangramento observável nos animais tratados. Os resultados demonstram a importante atuação da PCAr na ressuscitação microcirculatória de animais sob endotoxemia. Novos experimentos com infusões mais prolongadas, neste e em outros modelos de sepse experimental, são necessários para esclarecer possíveis novas ações microcirculatórias da PCAr.

7. Referências bibliográficas:

Abreu MT, Arditi M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *J Pediatr.* 2004; 144 (4): 421-429. Review

Aird WC. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med.* 2001; 29 (7 Suppl): 28-34. Review

Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003; 15;101(10): 3765-3777. Review

Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet.* 2005; 365 (9453) :63-78. Review

Anning PB, Finney SJ, Singh S, Winlove CP, Evans TW. Fluids reverse the early lipopolysaccharide – induced albumin leakage in rodent mesenteric venules. *Am J Pathol.* 2004; 165 (1): 331-40,

Baker CH, Sutton ET, Zhou Z, Dietz JR. Microvascular vasopressin effects during endotoxin shock in the rat. *Circ Shock.* 1990; 30(2): 81-95.

Baker CH, Sutton ET, Zhou Z, Reynolds DG. Reduced microvascular adrenergic receptor activity due to opioids in endotoxin shock. *Circ Shock.* 1990; 32(2):101-112.

Baker CH, Sutton ET, Price JM, Ortiz- Tweed M, Nessellroth S. Attenuation of arteriolar alpha 2 - adrenoceptor sensitivity during endotoxemia. *Am J Physiol.* 1994; 267 (6 Pt 2): H2171-2178.

Balk RA. Optimum treatment of severe sepsis and septic shock: evidence in support of the recommendations . *Dis Mon.* 2004; 50 (4): 168-213. Review

Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care.* 2003; 7(5):359-373. Review

Bateman RM, Walley KR. Microvascular resuscitation as a therapeutic goal in severe sepsis. *Crit Care.* 2005; 9 (4 Suppl): 27-32. Review

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. *N Engl J Med.* 2001; 344(10): 699-709.

Bilault P, Lavaux T, Launoy A, Gaub MP, Meyer N, Oudet P, Pottecher T, Jaeger A, Schneider F. Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax / Bcl -2 and Bax/ Bcl - xl ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients. *Crit Care Med.* 2007; 35 (1):69-75.

Bilbault P, Lavaux T, Launoy A, Gaub MP, Meyer N, Oudet P, Pottecher T, Jaeger A, Schneider F. Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients. *Crit Care Med.* 2007; 35(1): 69-75.

Buwalda M, Ince C. Opening the microcirculation: can vasodilators be useful in sepsis? *Intensive Care Med.* 2002; 28(9):1208-1217.

Cerchiara E, Tirindelli MC, Giannetti B, Dicuonzo G, Avvisati G. The numerous properties of the anticoagulant protein C. *Clin Ter.* 2007; 158 (2): 181-187. Review

Cunneen J, Cartwright M. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. *AACN Clin Issues.* 2004; 15 (1): 18-44. Review

Davenpeck KL, Zagorski J, Schleimer RP, Bochner BS. Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines. *J Immunol.* 1998; 161(12): 6861-6870.

De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166(1):98-104.

De Backer D, Vincent JL. Norepinephrine administration in septic shock: how much is enough? *Crit Care Med.* 2002; 30(6):1398-1399.

De Backer D, Verdant C, Chierigo M, Koch M, Gullo A, Vincent JL. Effects of drotrecogin alfa activated on microcirculatory alterations in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2006; 34 (7): 1918-1924.

De Backer D. Benefit – risk assessment of drotrecogin alfa (activated) in the treatment of sepsis. *Drug Saf.* 2007; 30 (11): 995-1010. Review

Dhainaut JF, Yan SB, Cariou A, Mira JP. Soluble thrombomodulin, plasma-derived unactivated protein C, and recombinant human activated protein C in sepsis. *Crit Care Med.* 2002; 30 (5 Suppl): 318-324. Review

Dhainaut JF, Yan SB, Margolis BD, Lorente JA, Russell JA, Freebairn RC, Spapen HD, Riess H, Basson B, Johnson G 3rd, Kinasevitz GT; PROWESS Sepsis Study Group. Drotrecogin alfa (activated) (recombinant human activated protein C) reduces host coagulopathy response in patients with severe sepsis. *Thromb Haemost.* 2003; 90(4):642-653.

Doherty TM, Arditi M. Innate immunity, Toll-like receptors and host response to infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; (7): 643-644. Review

Egan BM, Chen G, Kelly CJ, Bouchier-Hayes DJ. Taurine attenuates LPS-induced rolling and adhesion in rat microcirculation. *J Surg Res*. 2001; (2): 85-91.

Eichacker PQ, Danner RL, Suffredini AF, Cui X, Natanson C.: Reassessing recombinanthuman activated protein C for sepsis: time for a new randomized controlled trial. *Crit Care Med*. 2005; 33(10): 2426-2428.

Ellis CG, Jagger J, Sharpe M. The microcirculation as a functional system. *Crit Care*. 2005; 9 (4 Suppl): 3-8. Review

Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med*. 1980; 177(2):125-34.

Esmon CT. Protein C. *Prog Hemost Thromb*. 1984; 7: 25-54. Review

Esmon CT. Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis. *Baillieres Best Pract Clin Haematol*. 1994; 7: 453-68. Review

Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica*. 1999; 84 (3): 254-259.

Esmon CT. The anticoagulant and anti-inflammatory roles of the protein C anticoagulant pathway. *J Autoimmun*. 2000; 15 (2): 113-116. Review

Esmon CT. Does inflammation contribute to thrombotic events? *Haemostasis*. 2000; 30 (2 Suppl): 34-40. Review

Esmon CT. Role of coagulation inhibitors in inflammations. *Thromb Haemost*. 2001; 86 (1): 51-56. Review

Esmon CT. Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Critical Care Med*. 2001; 29 (7 Suppl): 48-51. Review

Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003; 124 (3 Suppl): 26-32. Review

Esmon CT. Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res*. 2003; 9 (3): 192-198. Review

Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res*. 2004; 114 (5-6): 321-327. Review

Esmon CT. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends Immunol*. 2004; 25 (10): 536-542. Review

Esmon, Charles T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med.* 2004; 32(5 Suppl): 219-222. Review

Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas.* 2004; 47 (4): 305-314. Review

Esmon CT. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32 (1 Suppl): 49 –60. Review

Grinnell BW, Joyce D. Recombinant human activated protein C: a system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis. *Crit Care Med.* 2001; 29 (7 Suppl): 53-60. Review

Guyton AC, Hall JE, A microcirculação e o sistema linfático: trocas de líquido capilar, líquido intersticial e fluxo da linfa. In Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica.* Editora Guanabara Koogan, 10th edition . 2002; 153-161.

Haas I. A new drug which saves lives. Sepsis: chaos in the body – recent aspects of pathophysiology and therapy. 2002; *Krankenpfl J.* 40 (10-12): 310.

Harris NR, Russell JM, Granger DN. Mediators of endotoxin – induced leukocyte adhesion mesenteric postcapillary venules. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008; 39: 99-111.

Hirose K, Okajima K, Taoka Y, Uchiba M, Tagami H, Nakano K, Utoh J, Okabe H, Kitamura N. Activated protein C reduces the ischemia/ reperfusion – induced spinal cord injury in rat by inhibiting neutrophil activation. *Ann Surg.* 2000; 232 (2): 272-280.

Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/ endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. *Shock.* 1999;12 (5): 355-364.

Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. Hydroxyethyl starch (130 kD), but not crystalloid volume support, improves microcirculation during normotensive endotoxemia. *Anesthesiology.* 2002; 97 (2): 460-470.

Hoffman JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. The thrombin antagonist hirudin fails to inhibit endotoxin – induced leukocyte/endothelial cell interaction and microvascular perfusion failure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 279(1): 98-107.

Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. Antithrombin reduces leukocyte adhesion during chronic endotoxemia by modulation of the cyclooxygenase pathway. *Am J Respir Critical Care Med.* 2000; 161(1): 36-43.

Hoffman JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Kaneider NC, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ, Römisch J, Schildberg FW, Menger MD. Adverse effect of heparin on antithrombin action during endotoxemia: microhemodynamic and cellular mechanisms. *Thromb Haemost.* 2002; 88(2) :242-252.

Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. Hydroxyethyl Starch (130 kD), but not crystalloid volume support, Improves Microcirculation during Normotensive Endotoxemia. *Anesthesiology*. 2002; 97(2): 460-470.

Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Fertmann J, Schildberg FW, Menger MD. Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med*. 2004; 32(4): 1011-1017.

Hoffman, Johannes N. Vollmar, Brigitte, Laschke, Matthias W., Inthorn, Dietrich , Fertmann, Jan, Schildberg, Friedrich W., Menger, Michael D. Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med*. 2004; 32 (4):1011-1017.

Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, NagakariK, Shirahama A, Ida Y. Activated protein C improves the visceral microcirculation by attenuating the leukocyte-endothelial interaction in a rat lipopolysaccharide model. *Crit Care Med*. 2005; 33 (2): 368-372.

Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005; 9(4 Suppl): 13-19. Review

Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Mizutani A, Harada N, Nagasaki A, Okabe K. Activated protein C prevents endotoxin – induced hypotension in rast by inhibiting excessive production of nitric oxide. *Circulation*. 2001; 104 (10): 1171-1175.

Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Harada N, Okabe H. Antithrombin prevents endotoxin – induced hypotension by inhibiting the induction of nitric oxide synthase in rats. *Blood*. 2002; 99 (5): 1638-1645.

Isobe H, Okajima K, Harada N, Lui W, Okabe H. Actived protein C reduces stress- induced gastric mucosal injury in rast by inhibiting the endothelial cell injury. *J Thromb Haesmost*. 2004; 2 (2) : 313-320.

Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2001; 276(14):11199-11203.

Joyce DE, Grinnell BW. Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulations nuclear factor – kappaB. *Crit Care Med*. 2002; 30 (5 Suppl): 288-293. Review

Joyce DE, Nelson DR, Grinnell BW. Leukocyte and endothelial cell interactions in sepsis: relevance of the protein C pathway. *Crit Care Med*. 2004; 32 (5 Suppl): 280-286. Review

Koike K, Sekine K, Endo T, Nomura R, Shinozawa Y. Animal for sepsis. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 2003; 104(11): 8004.

Krysztopik RJ, Bentley FR, Wilson MA, Spain DA, Garrison RN. Vasomotor response to pentoxifylline mediates improved renal blood flow to bacteremia. *Shock*. 1996; 5 (4): 251-257.

Krysztopik RJ, Bentley FR, Spain DA, Wilson MA, Garrison RN. Lazaroid improves intestinal blood flow in the rat during hyperdynamic bacteraemia. *Br J Surg*. 1997; 84 (12): 1717-1721.

Lehmann Ch, Feyerherd F, Feyerherd T, Foglioata M, Gründling M, Usichenko TI, Meissner K, Wendt M, Pavlovic D. Ketamine does not affect intestinal microcirculation in pentobarbital – anaesthetized rats during experimental endotoxaemia. *Critical Care*. 2006; 10 (6): 157.

Lehman C, Meissner K, Knöck A, Diedrich S, Pavlovic D, Gründling M, Usichenko T, Wendt M, Birnbaum J. Activated protein C improves intestinal microcirculation in experimental endotoxaemia in the rat. *Critical Care*. 2006; 10(6): 157.

Lehmann C, Scheibe R, Schade M, Meissner K, Gründling M, Usichenko T, Wendt M, Hung O, Whynot S, Murphy M, Pavlovic D. Effects of activated protein C on the mesenteric microcirculation and cytokine release during experimental endotoxemia. *Can J Anaesth*. 2008; 55 (3):155-162.

Levi M. Benefit of recombinant human activated protein C beyond 28-day mortality: there is more to life than death. *Crit Care Med*. 2003; (3): 984-985.

Levi M, Schultz MJ, Rijneveld AW, van der Poll T. Bronchoalveolar coagulation and fibrinolysis in endotoxemia and pneumonia. *Crit Care Med*. 2003; (4 Suppl): 238-242.

Levi M. Activated protein C in sepsis: a critical review. *Curr Opin Hematol*. 2008; 15(5): 481-486. Review

Levi M. The coagulant response in sepsis. *Clin Chest Med*. 2008; 29(4): 627-42.

Levi M, van der Poll T. The role of natural anticoagulants in the pathogenesis and management of systemic activation of coagulation and inflammation in critically ill patients. *Semin Thromb Hemost*. 2008; 34(5): 459-468. Review

Macias WL, Yan SB, Williams MD, Um SL, Sandusky GE, Ballard DW, Planquois JM. New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care*. 2005; 9 (4 Suppl): 38-45.

Mariscalco MM. Innate Immunity in Critical Care. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 2006; 17: 25-35.

Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, Wilmore DW. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N. Engl. J. Med*. 1988; 318:1481-1486.

O'Brien JM Jr, Abraham E. Human models of endotoxemia and recombinant human activated protein C. *Crit Care Med.* 2004; 32 (5 Suppl): 202-208.

Okajima K. Regulation of inflammatory responses by activated protein C: the molecular mechanism(s) and therapeutic implications. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42 (2): 132-141.

Okajima K. Prevention of endothelial cell injury by activated protein C: the molecular mechanism (s) and therapeutic implications. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004; 2 (2):125-33.

Opal SM. Interactions between coagulation and inflammation. *Scand J Infect Dis.* 2003; 35(9): 545-554.

Opal SM. Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr Crit Care Med.* 2005; (3 Suppl): 55-60.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia.* Editora Elsevier, 5 th edition. 2004; 246-260

Ragaller M, Theilen H, Koch T. Therapeutic options to improve the microcirculation in sepsis and septic shock. *Hamostaseologie.* 2007; 27 (1): 59-63.

Remick DG, Strieter RM, Eskandari MK, Nguyen DT, Genord MA, Raiford CL, Kunkel, SL. Role of tumor necrosis factor- α in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *Am. J. Pathol.* 1990;136: 49-60.

Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock.* 2000; 13:110-116.

Remick, Daniel G., Ward, Peter A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock.* 2005; 24: 7-11.

Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Ruf W. Activated protein C signals through the thrombin receptor PAR1 in endothelial cells. *J Endotoxin Res.* 2003; 9 (5): 317-321.

Riewald M, Ruf W. Protease- activated receptor –1 signaling by activated protein C in cytokine- perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280 (20): 19808-19814.

Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Jornaul of Leukocyte Biology.* 2007; 81(1):137-43.

Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M; Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001; 345(19):1368-1377.

Rivers EP, McIntyre L, Morro DC, Rivers KK. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. *CMAJ*. 2005;173(9):1054-1065.

Rivers EP, Coba V, Visbal A, Whitmill M, Amponsah D. Management of Sepsis: Early Resuscitation. *Clin Chest Med*. 2008; (4): 689-704.

Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2004; 32 (9): 1963-1964.

Scaldaferri F, Sans M, Vetrano S, Graziani C, De Cristofaro R, Gerlitz B, Repici A, Arena V, Malesci A, Panes J, Grinnell BW, Danese S. Crucial role of the protein C pathway in governing microvascular inflammation in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007; 117 (7): 1951-1960.

Schäper J, Ahmed R, Schäfer T, Elster A, Enigk F, Habazattl H, Mousa S, Schäfer M, Welte M. Volume therapy with colloid solutions preserves intestinal microvascular perfusion in endotoxaemia. *Resuscitation*. 2007; 76(1): 120-8.

Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, Bach A, Bohrer H, Martin E. Dopexamine maintains intestinal villus blood flow during endotoxemia in rats. *Critical Care Medicine*. 1996; 24 (7): 1233-1237.

Schumacher J, Pörksen M, Klotz KF. Effects of isoflurane, enflurane, and halothane on skeletal muscle microcirculation in the endotexemic rat. *J Critical Care*. 2001; 16(1):1-7.

Spain DA, Wilson MA, Bar-Natan MF, Garrison RN. Role of nitric oxide in the small intestinal microcirculation during bacteremia. *Circ Shock*. 1990; 32 (2): 101-112.

Trzeciak S, Rivers EP. Clinical manifestations of disordered microcirculatory perfusion in severe sepsis. *Crit Care*. 2005; 9 (4 Suppl): 20-26.

Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, Guglielmi M, Bajaj J, Abate NL, Arnold RC, Colilla S, Zanotti S, Hollenberg SM; Microcirculatory Alterations in Resuscitation and Shock Investigators. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med*. 2007; 49 (1): 88-98.

Ulloa L, Tracey KJ. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med*. 2005; 11(2): 56-63.

Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin – protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(8): 1374-1383.

Van de Wouwer M, Conway EM. Novel functions of thrombomodulin in inflammation. *Crit Care Med.* 2004; 32 (5 Suppl): 254-261.

van der Poll T, Levi M. Mechanisms of action of activated protein C: an evolving story. *Crit Care Med.* 2004; 32(4):1086-1087.

Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, Isetta AM, Grau G, Buurman W, van Tits LJH, Ghezzi P. Pattern of Cytokines and Pharmacomodulation in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture Compared with That Induced by Endotoxin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 1995; 2 (5): 549-553.

Vincent JL, De Backer D. Does disseminated intravascular coagulation lead to multiple organ failure? *Crit Care Clin.* 2005; (3): 469-477.

Vincent JL. Drotrecogin alpha (activated): the treatment for severe sepsis? *Expert Opin Biol Ther.* 2007; 7 (11): 1763-1777. Review

White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, O'Neill L, Kelleher D, Schwarz HP, Smith OP. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol.* 2000; 110(1):130-134.

Woodman RC, Teoh D, Payne D, Kubes P. Thrombin and leukocyte recruitment in endotoxemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279(3): H1338-1345.

Yan WS, Kan WH, Hang QB, Jiang Y, Wang SW, Zhao KS. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in different organs of the mice with endotoxic shock induced by lipopolysaccharide] *Sheng Li Xue Bao.* 2002; 54(1):71.

Yipp BG, Andonegui G, Howlett CJ, Robbins SM, Hartung T, Ho M, Kubes P. Profound differences in leukocyte-endothelial cell responses to lipopolysaccharide versus lipoteichoic acid. *J Immunol.* 2002; 168(9): 4650-4658.

Yuksel M, Okajima K, Uchiba M, Horiuchi S, Okabe H. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide- induced tumor necrosis factor- alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor – kappa B and activator protein-1 in human monocytes. *Thromb Haemost.* 2002; 88 (2): 267-273.

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](#)