

ANA CAROLINA CAVALCANTI PESSOA DE SOUZA

**Ação protetora da eritropoietina na injúria renal
aguda em modelo experimental de sepse**

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

Área de concentração: Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia da Conceição
Andrade

São Paulo

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica 12 (LIM12)
da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com suporte do
CNPq número 141823/2007-0.

Dedicatória

Ao meu Pai,

Que continua presente em todos os dias da minha vida através da luz dos seus ensinamentos e das felizes memórias dos anos que passamos juntos.

Através das lembranças da sua voz amiga e do seu apoio irrestrito quero compartilhar com você, meu pai, a alegria da conclusão desta Tese.

“Porque só o Amor é tão forte quanto a Morte.”

Cântico dos Cânticos 8:6

Agradecimientos

A Deus,

Por permitir que tudo isto fosse possível e por sempre me guiar na minha vocação de médica e, agora, de pesquisadora. Amém!

À minha família,

Aos meus pais, Maria e José, por todo o amor dedicado e por sempre priorizarem a educação dos seus filhos. Por todo o apoio, incentivo e compreensão em todas as etapas da minha vida.

Aos meus irmãos Henrique José e Adriana Maria, meus grandes amigos e companheiros, por sempre me incentivarem na Medicina e compreenderem a minha ausência física em momentos importantes de nossas vidas. Obrigada por torcerem por mim de forma tão entusiasmada. Aos meus cunhados Daniela e Fernando e aos meus sobrinhos Júlia e José Henrique. O apoio e a compreensão de todos vocês foram essenciais para que eu seguisse o meu caminho.

Aos meus padrinhos, Tio Romero e Tia Lourdinha, e a todos os meus tios, tias, primos e primas que sempre me apoiaram e estiveram presentes na minha vida. A torcida de todos vocês é muito importante para mim.

Ao LIM 12,

À Professora Dra. Lúcia Andrade, que escolhi como minha orientadora desde a época da Residência em Nefrologia por admirar sua inteligência e trabalho, pela orientação científica deste estudo. Ao Professor Dr. Antônio Carlos Seguro pela empolgação contagiante com a pesquisa científica.

Ao querido Dr. Rildo Volpini, pela enorme dedicação ao estudo, sempre me ensinando coisas novas e discutindo comigo todas as etapas. Muito obrigada por tudo, Bruxo! À Talita Sanches, pela amizade e por tudo o que me ensinou no laboratório. À bióloga Ana Carolina de Bragança, por estar sempre disposta a ajudar no que fosse possível. À querida Dra. Maria Heloísa Shimizu, por realizar comigo os *clearances* de inulina dos nossos animais.

Ao Dr. Magaldi, por me ensinar a segurar os ratos (sem levar mordidas) quando cheguei ao laboratório e por sempre estar disponível para nos ajudar com os aparelhos.

À Eloá pela organização do laboratório. À Ciça pelos cuidados no biotério e por várias vezes ter nos auxiliado com os animais. Ao meu querido Nivaldo pelas conversas diárias e pela companhia para o cafezinho. Obrigada pela amizade e por estar sempre disposto a ajudar em qualquer situação.

Quero agradecer ao Rildo, à Talita, à Carolzinha, à Helô, à Dra. Lúcia e ao Dr. Seguro, por todos os momentos que tivemos de confraternização e descontração tanto no laboratório quanto em viagens para congressos.

*Aos meus amigos e a todos os que participaram da
minha formação,*

Aos meus colegas da turma 2001.1 “Médicos do Século XXI, por uma Medicina mais humana”, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Pernambuco, por todo o apoio, amizade e torcida; e por nunca me esquecerem. Obrigada pela empolgação de vocês com as minhas conquistas. Agradeço também a todos os professores desta mesma querida instituição onde me formei médica.

Aos Professores do Departamento de Medicina Interna da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), onde realizei residência médica em Medicina Interna, e aos meus colegas e amigos de residência, por terem me recebido tão bem na “terra dos pampas”.

Ao querido Dr. Luciano Marini, pela amizade e por tudo o que me ensinou na Unidade de Cuidados Especiais da PUCRS. Aos seus pais, Célio e Elisabeth Marini, por todo o carinho e amizade.

Aos Professores da Disciplina de Nefrologia da PUCRS, pela amizade e incentivo constantes e por todos os ensinamentos. O exemplo do trabalho de vocês, com grande dedicação aos pacientes nefrológicos, sem dúvida influenciou na minha escolha de seguir na Nefrologia.

Ao meu querido amigo e Professor Dr. Moacir Traesel, por me ensinar que quando realizamos nossas tarefas com amor, sempre somos bem recompensados e que, no final, tudo acaba dando certo. Moa, muito obrigada por tudo! Sem a sua ajuda talvez nada disso teria sido possível!

Aos amigos que conheci em São Paulo: Cristianne Alexandre, amiga e companheira de residência médica em Nefrologia, colega de quarto na moradia do HCFMUSP e colega de pós-graduação no LIM 12; Pércia Bezerra, que também conheci durante a residência em Nefrologia; Alexandre Azevedo, por sempre me escutar e por ser tão paciente; Ademiton Rocha Júnior e Renata Maciel, pela companhia, carinho e incentivo constantes.

Aos Professores e colegas de turma do Curso Bioética e Direito (2008.1) realizado na Faculdade de Direito São Francisco da Universidade de São Paulo, como parte dos meus créditos para obtenção do meu grau de Doutora. A convivência com vocês e a união de toda a turma foi uma experiência única e muito gratificante.

Aos Professores Dra. Irene Noronha, Dr. Hugo Abensur, Dr. João Egídio Romão Júnior e à Dra Maria Regina Araújo, pela amizade, apoio e carinho no ambiente de trabalho. Obrigada pela oportunidade de continuar aprendendo com vocês. Aos meus amigos e colegas de trabalho, Pércia Bezerra, Adriana Castro, Giovanio Vieira e Raquel Siqueira, pelo carinho e compreensão com as trocas de horários. Aos estagiários em Nefrologia do Hospital da Beneficência Portuguesa de São Paulo – tanto os atuais quanto os que passaram e também os que virão – por me darem mais um motivo para continuar estudando sempre.

Ao Professor Dr. Roberto Zatz e a todos os Professores da Disciplina de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, onde realizei residência médica em Nefrologia; e ao Professor Dr. Rui Toledo Barros, coordenador do programa de pós-graduação em Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

*"Uma mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de unidades, medidas e abreviaturas utilizadas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Definição de sepse	2
1.2. Epidemiologia da sepse e da injúria renal aguda relacionada à sepse	5
1.3. Fisiopatologia da sepse e da injúria renal aguda relacionada à sepse	9
1.3.1. Resposta imunológica e inflamatória	9
1.3.2. Cascatas de coagulação na sepse	11
1.3.3. Fisiopatologia da IRA na sepse	12
1.3.4. Papel fundamental do NF- kB na fisiopatologia da sepse e da IRA relacionada à sepse	14
1.3.5. Papel da enzima NO sintase endotelial (eNOS) na fisiopatologia da sepse e da IRA relacionada à sepse	15
1.4. Modelos animais de sepse	17
1.5. A Eritropoietina e suas ações pleiotrópicas	19
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Animais e protocolos de experimentos	26
3.2. Etapas	26
3.3. Grupos	27
3.4. Procedimento cirúrgico	27
3.5. PRIMEIRA ETAPA: Estudo Precoce – 24 horas após LPC	29
3.5.1. <i>Clearance</i> de inulina	30

3.5.2. Aferição direta da pressão arterial média (PAM)	31
3.5.3. Avaliação da gasometria arterial, do hematócrito e do lactato arterial	31
3.6. SEGUNDA ETAPA: Estudo Tardio – 48 horas após LPC	32
3.6.1. <i>Clearance</i> de creatinina	33
3.6.2. Aferição direta da pressão arterial média (PAM)	33
3.6.3. Quantificação da creatinina e do sódio nas amostras de sangue e urina	34
3.6.4. Coleta do tecido renal para análise histológica, imunohistoquímica e para <i>Western blot</i>	34
3.6.5. Imunohistoquímica.....	35
3.6.6. Avaliação dos resultados de imunohistoquímica	36
3.6.7. Coleta de tecido renal para estudos de <i>Western blot</i>	37
3.6.8. Extração de proteínas para <i>Western blot</i>	37
3.6.9. <i>Western blot</i>	38
3.6.10. Semi-quantificação das proteínas.....	38
3.6.11. Análise histológica e morfométrica.....	39
3.7. TERCEIRA ETAPA: Análise de Sobrevida.....	40
3.8. Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Resultados da PRIMEIRA ETAPA: Estudo Precoce – 24 após LPC	42
4.1.1. Resultados gerais da Primeira Etapa (Estudo Precoce).....	43
4.1.2. Efeito da EPO sobre o <i>clearance</i> de inulina 24 horas após indução da sepse	44
4.1.3. Efeito da EPO sobre o hematócrito 24 horas após indução da sepse.....	45
4.1.4. Efeito da EPO sobre a pressão arterial média (PAM) 24 horas após indução da sepse	46
4.1.5. Efeito da EPO sobre a acidose metabólica 24 horas após indução da sepse.....	47

4.1.6. Efeito da EPO sobre o lactato arterial 24 horas após indução da sepse.....	49
4.2. Resultados da SEGUNDA ETAPA: Estudo Tardio – 48 horas após LPC.....	50
4.2.1. Resultados gerais da Segunda Etapa (Estudo Tardio)	51
4.2.2. Efeito da EPO sobre o <i>clearance</i> de creatinina 48 horas após indução da sepse	52
4.2.3. Efeito da EPO sobre a fração de excreção de sódio 48 horas após indução da sepse	53
4.2.4. Efeito da EPO sobre a pressão arterial média (PAM) 48 horas após indução da sepse	54
4.2.5. Efeito da EPO sobre a área intersticial relativa (AIR) 48 horas após indução da sepse	55
4.2.6. Efeito da EPO sobre o número de células ED1 positivas no tecido renal 48 horas após indução da sepse	57
4.2.7. Efeito da EPO sobre a expressão do NF- κ B no tecido renal 48 horas após indução da sepse	60
4.2.8. Efeito da EPO sobre a expressão da enzima NO sintase endotelial no tecido renal 48 horas após indução da sepse	62
4.3. Resultado da TERCEIRA ETAPA: Análise de Sobrevida.....	63
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS.....	80

Listas

LISTA DE UNIDADES, MEDIDAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS

>	= Maior que
<	= Menor que
° C	= Graus centígrados
ATB	= Antibiótico
AVC	= Acidente vascular cerebral
Bpm	= Batimentos por minuto
CIVD	= Coagulação intravascular disseminada
dl	= Decilitros
eNOS	= Enzima óxido nítrico sintase endotelial
EPO	= Eritropoietina
FE Na	= Fração de excreção de sódio
FiO ₂	= Fração inspirada de oxigênio
FR	= Frequência respiratória
GMPc	= Guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato
IFN – gamma	= Interferon gamma
IL- 6	= Interleucina 6
IL- 10	= Interleucina 10
iNOS	= Enzima óxido nítrico sintase induzível
IRA	= Injúria renal aguda
IRC	= Insuficiência renal crônica
Kg	= Quilogramas
LPC	= Ligadura e punção do ceco
LPS	= Lipopolissacarídeo
mEq	= Miliequivalentes

mg	= Miligramas
ml	= Mililitros
mmHg	= Milímetros de mercúrio
NF- κB	= Fator nuclear de transcrição; <i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	= Óxido nítrico
NOS	= Óxido nítrico sintases
PAI- 1	= <i>plasminogen-activator inhibitor type- 1</i>
PAM	= Pressão arterial média
PaO ₂	= Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PaS	= Pressão arterial sistólica
PCO ₂	= Pressão parcial de monóxido de carbono no sangue arterial
RNI	= Relação normatizada internacional
RNM	= Ressonância nuclear magnética
SARA	= Síndrome da angústia respiratória do adulto
SF 0,9%	= Soro fisiológico 0,9%
SIRS	= Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SVO ₂	= Saturação venosa de oxigênio
TLR	= Receptor <i>Toll-like</i>
TLRs	= Receptores <i>Toll-like</i>
TNF- α	= Fator de necrose tumoral alfa
TP	= Tempo de atividade da protrombina
TTPA	= Tempo de tromboplastina parcial ativada
UI	= Unidades Internacionais
UTI	= Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Gráfico ilustrativo da cronologia da primeira etapa29
- Figura 2 -** Gráfico ilustrativo da cronologia da segunda etapa.....32
- Figura 3 -** Fotomicrografias de cortes histológicos de córtex renal corados com Tricrômio de Masson de um rato controle (A) e de ratos sacrificados 48h após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) (B) ou LPC+EPO (C).56
- Figura 4 -** Imunolocalização de células ED-1 positivas (macrófagos e monócitos) em cortes de córtex renal de um rato controle (A) e de ratos sacrificados 48h após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) (B) ou LPC+EPO (C).59
- Figura 5 -** Imunolocalização do NF- κ B no córtex renal de um rato controle (A) e de ratos sacrificados 48 h (B e C) após a cirurgia de LPC tratados (C) ou não (B) com EPO.61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados gerais da PRIMEIRA ETAPA (Estudo Precoce).43

Tabela 2 - Resultados gerais da SEGUNDA ETAPA (Estudo Tardio).....51

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 -** Taxa de filtração glomerular (TFG) avaliada após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.44
- Gráfico 2 -** Hematócrito plasmático avaliado após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.45
- Gráfico 3.** Pressão arterial média (PAM) avaliada após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.....46
- Gráfico 4 -** Bicarbonato plasmático avaliado após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.47
- Gráfico 6 -** pH plasmático avaliado após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.48
- Gráfico 8 -** Lactato plasmático avaliado após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.49
- Gráfico 9 -** Taxa de filtração glomerular (TFG) avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.52

Gráfico 10 - Fração de excreção de sódio (FENa) avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.....	53
Gráfico 11 - Pressão arterial média (PAM) avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.....	54
Gráfico 12 - Porcentagem da área intersticial relativa (AIR) do córtex renal avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.	55
Gráfico 13 - Número de células ED-1 positivas no córtex renal avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina.....	58
Gráfico 14 - Escore para NF- κ B no compartimento túbulo-intersticial (CTI) do córtex renal de ratos controles e de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina sacrificados 48h após as intervenções cirúrgicas.	60
Gráfico 15 - Análise densitométrica para eNOS citoplasmático no córtex renal avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com EPO.....	62
Gráfico 16 - Curvas de sobrevivência dos grupos Controle, LPC e LPC+EPO.....	64

Resumo

Souza ACCP. *Ação protetora da eritropoietina na injúria renal aguda em modelo experimental de sepse* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 95p.

A sepse envolve mecanismos complexos de respostas imunológicas e inflamatórias, e o papel do NF- κ B é essencial. A diminuição da NO sintase endotelial (eNOS) durante a sepse contribui com a disfunção endotelial. A eritropoietina (EPO) é uma citocina protetora de diversos tecidos durante o estresse. Investigamos o papel da EPO na injúria renal aguda (IRA) induzida pela sepse usando o modelo de ligadura e punção do ceco (LPC). Ratos Wistar foram divididos em três grupos: controle; LPC e LPC+EPO (EPO, 4.000UI/kg, administrada 24h e 1h antes da cirurgia). Com a finalidade de estudar os efeitos precoces e tardios da EPO sobre a IRA induzida pela sepse realizamos três etapas de experimentos: Primeira etapa: 24 horas após LPC; Segunda etapa: 48 horas após LPC; Terceira etapa: análise de sobrevida. No estudo precoce o grupo LPC+EPO apresentou *clearance* de inulina significativamente maior que o grupo LPC. Recuperou os níveis de hematócrito na sepse, melhorou a pressão arterial e a acidose metabólica. No estudo tardio o grupo LPC+EPO apresentou *clearance* de creatinina significativamente maior que o grupo LPC. Nesta fase tardia a EPO recuperou os níveis de eNOS, suprimiu a infiltração de macrófagos no tecido renal e inibiu a ativação do NF- κ B. A EPO protege a função renal e aumenta a sobrevida neste modelo de sepse. A proteção da EPO na sepse é dependente, em parte, da inibição do NF- κ B e do aumento da expressão de eNOS.

Descritores: 1. Ratos Wistar; 2. Sepse; 3. Insuficiência Renal Aguda; 4. Eritropoietina; 5. Óxido nítrico sintase tipo III; 6. NF- κ B.

Summary

Souza ACCP. *Erythropoietin protects from Acute Kidney Injury in a Experimental Model of Sepsis* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 95 p.

The pathophysiology of sepsis involves complex cytokine and inflammatory mediator networks, a mechanism to which nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation is central. Downregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) contributes to sepsis-induced endothelial dysfunction. Erythropoietin (EPO) has emerged as a major tissue-protective cytokine in the setting of stress. We investigated the role of EPO in sepsis-related acute kidney injury (AKI) using a cecal ligation and puncture (CLP) model. Wistar rats were divided into three groups: control (sham-operated); CLP-only; and CLP+EPO. The EPO (4000 IU/kg BW, i.p.) was administered 24 h and 1 h before CLP. To study the early and late effects of EPO on sepsis-induced AKI, we performed experiments at 24 h and 48 h after CLP/sham operation, and we plotted the survival curves. At post-procedure hour 24, CLP+EPO rats presented significantly higher inulin clearance than did CLP-only rats; EPO treatment restored hematocrit levels, as well as mean arterial pressure and metabolic balance. At post-procedure hour 48, CLP+EPO rats presented significantly higher creatinine clearance than did CLP-only rats; EPO treatment restored eNOS levels, suppressed macrophage infiltration, and inhibited NF- κ B activation, thereby increasing survival. In conclusion, EPO protects renal function and increases survival in this model of sepsis-induced AKI. This protection is dependent on eNOS activation and is partly due to inhibition of the inflammatory response via downregulation of NF- κ B.

Descriptors: 1. Wistar rats; 2. Sepsis; 3. Renal insufficiency, Acute; 4. Erythropoietin; 5. Nitric oxide synthase type III; 6. NF- κ B.

1. Introdução

1.1. Definição de sepse

A palavra sepse é derivada da palavra grega “σηψις”, que significa decomposição de material orgânico, animal ou vegetal. Esta palavra foi utilizada pela primeira vez há mais de 2.700 anos por Homero e, somente há cerca de 100 anos atrás, que a ligação entre a presença de bactérias e sinais de doença sistêmica foi feita. Desde então, a palavra sepse tornou-se praticamente um sinônimo de “infecção severa”. Porém, atualmente, com os avanços dos conhecimentos na área do sistema imunológico, ficou evidente que a sepse está na verdade mais relacionada à resposta do hospedeiro ao microorganismo infectante do que relacionada a características específicas do microorganismo.^{1, 2, 3}

A sepse é um processo complexo que pode acometer qualquer pessoa e pode se originar de vários sítios, além de poder ser causada por uma grande quantidade de microorganismos. Na prática clínica, a sepse se apresenta sob diversas formas, com uma grande variedade de sinais e sintomas. Não há sintomas específicos para sepse e estes variam de um paciente para outro, além de também poderem se modificar em um mesmo paciente ao longo do curso da doença. Os sintomas da sepse podem variar desde sintomas muito leves até o choque séptico. Então, devido à grande variabilidade clínica dos sintomas da sepse, sua definição se torna difícil.³

Conforme o consenso da Conferência Internacional de Definições de Sepse, formada por diversas sociedades médicas norte-americanas e

européias em 2001, a sepse é definida como a resposta inflamatória sistêmica a um processo infeccioso.⁴ E, conforme o Consenso Internacional de Definições de Sepse definido nesta conferência, os critérios diagnósticos de sepse⁴ são:

Presença de infecção suspeita ou documentada e um dos seguintes critérios:

Variáveis gerais:

- Febre (temperatura axilar > 38,3 °C)
- Hipotermia (temperatura axilar < 36,0 °C)
- Frequência cardíaca > 90 bpm
- Taquipnéia (FR > 20 ipm ou PCO₂ < 32 mmHg)
- Alteração do estado mental
- Edema significativo ou balanço hídrico positivo (> 20 ml/Kg em 24h)
- Hiperglicemia (glicemia > 120 mg /dl na ausência de diabetes)

Variáveis inflamatórias:

- Leucocitose (> 12.000 leucócitos/ mm³)
- Leucopenia (< 4.000 leucócitos/ mm³)
- Contagem de leucócitos normal, porém com mais de 10% de formas imaturas
- Proteína C reativa plasmática > que 2 desvios padrões acima dos valores normais
- Procalcitonina plasmática > que 2 desvios padrões acima dos valores normais

Variáveis hemodinâmicas

- Hipotensão arterial (PaS < 90 mmHg, PAM < 70 mmHg ou queda na PaS > 40 mmHg)
- SVO₂ > 70%
- Índice cardíaco > 3,5 litros/ minuto

Variáveis de disfunção orgânica

- Hipoxemia arterial (PaO₂/ FiO₂ < 300)
- Oligúria (débito urinário < 0,5 ml/ Kg/ hora por pelo menos 2 horas)
- Aumento da creatinina > 0,5 mg/ dl
- Alterações da coagulabilidade (RNI > 1,5 ou TTPA > 60 segundos)
- Íleo paralítico
- Trombocitopenia (< 100.000 plaquetas/ mm³)
- Hiperbilirrubinemia (bilirrubinas totais > 4 mg/ dl)

Varáveis de perfusão tissular

- Hiperlactatemia (> 1 mmol/l)
- Perfusão tissular periférica lentificada

Conforme a conferência-consenso do *American College of Chest Physicians* e da *Society of Critical Care Medicine*⁵ a sepse pode ser classificada quanto à sua severidade em:

- Sepse severa - Presença de sepse acompanhada de um ou mais sinais e/ ou sintomas de hipoperfusão tecidual ou disfunção orgânica como: áreas de pele moteada; tempo de enchimento capilar maior que 3 segundos; oligúria (débito urinário < 0,5 ml/ Kg/ hora por pelo menos 2

horas); lactato arterial > 2 mmol/l; alterações abruptas do estado mental ou alterações inespecíficas no eletroencefalograma; plaquetopenia ou coagulação intravascular disseminada (CIVD); lesão pulmonar aguda ou SARA; disfunções cardíacas.

- Choque séptico – Presença de sepse severa e mais uma das seguintes condições: PaS < 60 mmHg (ou menor que 80 mmHg se paciente com história prévia de hipertensão arterial sistêmica) após infusão de 40 a 60 ml/ Kg de cristalóides ou 20 a 30 ml/ Kg de colóides ou necessidade de drogas vasoativas (dopamina > 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ ou noradrenalina $< 0,25$ $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$) para manter PAM > 60 mmHg (ou > 80 mmHg se história de hipertensão no passado).
- Choque séptico refratário – Necessidade de doses mais elevadas de drogas vasoativas (dopamina > 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ ou noradrenalina $> 0,25$ $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$) para manter PAM > 60 mmHg (ou > 80 mmHg se história de hipertensão no passado).

1.2. Epidemiologia da sepse e da IRA relacionada à sepse

A sepse e o choque séptico constituem um importante problema de saúde pública e resultam em cerca de 751.000 casos e em 215.000 mortes anualmente nos Estados Unidos da América (EUA), o que representa 10% de todas as causas de morte ao ano naquele país, com um custo de cerca de 16,7 bilhões de dólares ao ano. O número de mortes por sepse ao ano

nos EUA excede o número de mortes associadas ao infarto agudo do miocárdio.⁶

A mortalidade na sepse e no choque séptico permanece muito alta e não tem apresentado redução importante nas últimas décadas.^{7, 8, 9, 10}

No Brasil, o estudo BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*), desenvolvido em cinco Unidades de Terapia Intensiva dos estados de São Paulo e Santa Catarina, mostrou uma incidência de sepse, sepse grave e choque séptico de 46,9%, 27,3% e 23%, respectivamente. A mortalidade nestes pacientes foi 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente.¹¹

Um estudo multicêntrico, de coorte, prospectivo, realizado em 65 hospitais de todas as regiões do Brasil, identificou 3.128 pacientes admitidos em UTIs e destes pacientes 521 (16,7%) apresentaram sepse. A mortalidade global no grupo dos pacientes sépticos foi de 46,6%, enquanto a mortalidade nos subgrupos sepse, sepse grave e choque séptico foi de 16,7%, 34,4% e 65,3%, respectivamente. Os principais sítios de infecção foram: pulmonar (69 %), abdominal (23,1%) e urinário (16%).¹²

A mortalidade no choque séptico no Brasil, quando comparada com a mortalidade relatada em outros estudos multicêntricos internacionais, é uma das mais elevadas do mundo. Em um estudo multicêntrico internacional a mortalidade intra-hospitalar por sepse no Brasil foi de 56%, contra 30% de mortalidade intra-hospitalar por sepse nos países desenvolvidos e 45% nos demais países em desenvolvimento que participaram do estudo.¹³

Cerca de 50% dos pacientes com sepse desenvolvem injúria renal aguda (IRA).^{9, 10} A mortalidade entre os pacientes sépticos que desenvolvem IRA chega a cerca de 70%, maior que a mortalidade de 45% associada à presença de IRA de outra etiologia não relacionada à sepse.⁹ O desenvolvimento de IRA em pacientes com sepse prediz um pior prognóstico.⁹ Pacientes críticos internados em UTI com IRA relacionada à sepse apresentam taxas de mortalidade maiores que pacientes com IRA não relacionada à sepse.¹⁵

Na verdade, a incidência de IRA na sepse e as taxas de mortalidade da IRA na sepse variam muito entre os estudos e esta variação é em parte justificada pelos diferentes critérios utilizados nos estudos para definição de IRA.¹⁶ Em 2004 o grupo ADQI (*Acute Dialysis Quality Initiative*) criou uma definição de IRA baseada nos valores de creatinina sérica e/ou no débito urinário, o que ficou conhecido como os critérios de RIFLE¹⁷:

R – RISK – Aumento de 1,5 X (vezes) sobre a creatinina basal, ou queda no ritmo de filtração glomerular maior que 25%, e/ou presença de débito urinário menor que 5 ml/Kg/hora nas últimas 6 horas.

I – INJURY - Aumento de 2,0 X sobre a creatinina basal, ou queda no ritmo de filtração glomerular maior que 50%, e/ou presença de débito urinário menor que 5 ml/Kg/hora nas últimas 12 horas.

F – FAILURE - Aumento de 3,0 X sobre a creatinina basal, ou queda no ritmo de filtração glomerular maior que 75%, ou creatinina sérica maior ou

igual a 4 mg/dl; e/ou presença de débito urinário menor que 3 ml/Kg/hora nas últimas 24 horas ou anúria nas últimas 12 horas.

L – LOSS - Persistência da IRA com necessidade de terapia de substituição renal por mais de 4 semanas.

E – ESRD (*end stage renal disease*) - Necessidade de terapia de substituição renal por mais de 3 meses.

Estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego realizado recentemente para comparar a infusão de noradrenalina ou vasopressina nos desfechos de IRA no choque séptico utilizou os critérios de RIFLE para definição de IRA. Neste estudo, dentre os 778 pacientes com choque séptico avaliados, 59,6% apresentaram IRA no início do estudo e isto foi relacionado a uma mortalidade ao final de 28 dias significativamente maior que os pacientes sépticos sem IRA (44,3 vs. 27%, $p < 0,001$). Ao longo do estudo, outros 117 pacientes com função renal normal no início apresentaram IRA chegando a um total de 581 pacientes entre 778 (74,6%) que apresentaram IRA em algum momento do estudo.¹⁶

Apesar dos recentes avanços em suporte avançado de vida e na melhora da capacidade em ressuscitar pacientes em ambientes de UTI, a incidência e a mortalidade da IRA relacionada à sepse continua muito elevada⁷ e a prevenção da IRA em ambiente de UTI continua sendo um grande desafio.

1.3. Fisiopatologia da sepse e da IRA relacionada à sepse

A sepse é o resultado de interações complexas entre o microorganismo infectante e as respostas imunológicas, inflamatórias e de coagulação do hospedeiro infectado.¹⁸

1.3.1. Respostas imunológica e inflamatória

A resposta imune inata é responsável pelo processo inflamatório inicial na sepse. Ela é mediada pelos receptores de reconhecimento padrão, como os receptores *Toll-like* (TLR) e o CD14, que reconhecem os patógenos ou seus produtos, identificados como PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos – *pathogen-associated molecular patterns*). Os receptores *Toll-like* (TLRs) após reconhecerem a invasão de patógenos iniciam a resposta imunológica.^{19,20} Os TLRs são proteínas trans-membrana e constituem os primeiros mediadores da associação entre os agentes patógenos e as células do sistema imunológico.²¹

Os TLR-2 reconhecem os peptídeoglicanos das bactérias gram positivas, e os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram negativas são reconhecidos pelos TLR-4.¹⁸

A ligação dos microorganismos aos TLRs ativa uma cascata de vias intracelulares que levam à ativação do NF- κ B citoplasmático. O NF- κ B é um fator de transcrição que, quando ativado, move-se do citoplasma para o núcleo onde se liga a sítios de iniciação de transcrição de citocinas

inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e a interleucina- 1 (IL- 1β), e citocinas anti-inflamatórias como a interleucina- 10 (IL- 10).^{18, 20, 21}

As citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos e nas células endoteliais.¹⁸ Os neutrófilos são ativados pelas citocinas e, embora os neutrófilos ativados destruam microorganismos, eles também causam aumento da permeabilidade vascular ocasionando edema tecidual.¹⁸

Citocinas como a TNF- α induzem a enzima NO sintase induzível (iNOS).²² As células endoteliais ativadas pelas citocinas inflamatórias liberam óxido nítrico após o aumento da atividade e expressão da iNOS durante a sepse, e o óxido nítrico é um potente vasodilatador que tem papel fundamental na patogênese do choque séptico.²⁰ Desta forma, a vasodilatação que acompanha a sepse é mediada, em parte, por citocinas que promovem o aumento da expressão da iNOS na vasculatura.²³ Além da vasodilatação arterial, o aumento do óxido nítrico na sepse também está envolvido com a redução da resistência vascular periférica, que é uma característica da sepse.²²

A evidência de que camundongos *knock-out* para iNOS são protegidos da hipotensão durante a endotoxemia veio suportar o efeito vasodilatador (e hipotensor) da iNOS na sepse.²⁴ Estes achados de laboratório levaram à realização de um estudo clínico prospectivo para examinar o papel do inibidor da NO sintase sobre a mortalidade na sepse. Porém o inibidor inespecífico da NO sintase utilizado no estudo, além de

bloquear os efeitos da iNOS, bloqueou também os efeitos da eNOS (NO sintase endotelial ou constitutiva) e aumentou a mortalidade na sepse.²⁵

A ativação dos monócitos e macrófagos e a intensa ação dos mediadores iniciais acarretam a síntese de outras citocinas, como IL- 6, IL- 8, IL- 10 e HMGB1 (*high mobility group protein box 1*), com vários efeitos sinérgicos e antagônicos na resposta inflamatória. A secreção de IL- 6 leva à reprogramação da expressão gênica hepática, a chamada “resposta de fase aguda”, caracterizada pela produção de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa e a supressão das proteínas negativas de fase aguda, como a albumina.¹⁹

1.3.2. Cascatas de coagulação na sepse

Além da inflamação, os microorganismos também ativam a cascata da coagulação, com aumento dos fatores pró-coagulantes e redução dos anticoagulantes. A coagulação é iniciada através da expressão do fator tecidual na superfície das células endoteliais e monócitos, um evento que pode ser desencadeado por produtos bacterianos como endotoxinas e por componentes da superfície celular ou por citocinas pró inflamatórias.²⁰

O LPS estimula as células endoteliais a produzir o fator tecidual, o qual, na superfície celular, ativa o fator VII resultando no complexo fator VII ativado e fator tecidual que converte o fator X em X ativado. Em conjunto com o fator V ativado, o fator X ativado converte a protrombina em trombina, o que por sua vez resulta na clivagem do fibrinogênio em fibrina. Embora a

deposição de fibrina tenha papel importante na hemostasia e na localização de microorganismos, a coagulação intravascular impede a chegada de oxigênio aos tecidos e pode induzir nova lesão inflamatória. Por sua vez, o receptor da trombina ativa o NF- κ B, acarretando a transcrição de genes de mediadores inflamatórios e síntese de óxido nítrico.²⁶

Os fatores anticoagulantes endógenos como a proteína C, a proteína S, antitrombina III e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI – *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) modulam a coagulação, aumentando a fibrinólise e removendo os microtrombos. Na sepse, o LPS e o TNF- α diminuem a síntese de trombosmodulina e diminuem o receptor endotelial da proteína C, impedindo a ativação da proteína C e aumentando a síntese do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) e, em última instância, interrompendo a fibrinólise.¹⁸ Deste modo, a sepse pode ser vista como um estado pró-coagulante que pode levar à CIVD com coagulopatia de consumo e fenômenos trombóticos e hemorrágicos.

A ativação das cascatas de coagulação na sepse promove a produção de mediadores inflamatórios e amplifica o processo de inflamação.²⁷

1.3.3. Fisiopatologia da IRA na sepse

Os mecanismos da IRA relacionada à sepse ainda não estão bem definidos. Diversos mecanismos têm sido propostos para a fisiopatologia da IRA na sepse: além das conseqüências das reações inflamatórias sistêmicas

(como, por exemplo, a produção local de citocinas no tecido renal), a hipoperfusão renal secundária à vasodilatação sistêmica ou secundária às alterações na microcirculação dos capilares peritubulares também tem sido considerada como mecanismo de IRA na sepse,¹⁴ ou, ainda, a disfunção tubular induzida pelo estresse oxidativo.²⁸

Por muitos anos acreditou-se que a IRA relacionada à sepse seria secundária à isquemia renal resultante de um fluxo plasmático renal reduzido: após a vasodilatação arterial que ocorre na sepse, com a redução da pós carga, os barorreceptores arteriais identificam a sensação de *underfilling* resultante da vasodilatação e levam ao aumento no tônus simpático e à ativação do sistema renina angiotensina aldosterona, o que resultaria na vasoconstrição renal e retenção de sódio e água, predispondo à IRA.¹⁴ No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a circulação renal também participa da vasodilatação sistêmica que ocorre na sepse, e que o desenvolvimento da IRA relacionada à sepse, ao contrário de ocorrer num contexto de hipoperfusão renal, acontece na presença de fluxo plasmático renal adequado ou até mesmo aumentado.^{29, 30} A CIVD que ocorre na sepse tem sido associada a microtrombos glomerulares e IRA.^{14, 31}

Os radicais livres também têm papel importante no desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos e choque séptico^{32, 33} contribuindo para a fase de vasoconstrição renal que ocorre na IRA induzida pela sepsis.^{28, 31}

A necrose tubular aguda não é encontrada em animais sépticos submetidos a LPC.³⁴ Da mesma forma, uma revisão sistemática recente sobre a histopatologia da IRA relacionada à sepse demonstrou que a

necrose tubular aguda é incomum na sepse e que as alterações histopatológicas renais durante a sepse são mínimas, tanto em humanos (estudos *post mortem*) quanto em animais.³⁵

1.3.4. Papel fundamental do NF- κ B na fisiopatologia da sepse e da IRA relacionada à sepse

A ativação do NF- κ B tem papel fundamental na fisiopatologia da sepse. O NF- κ B media a transcrição de um grande número de genes cujos produtos apresentam papéis importantes na fisiopatologia da sepse.^{20, 27} Camundongos deficientes destes genes dependentes do NF- κ B são resistentes ao desenvolvimento do choque séptico e apresentam menor mortalidade na sepse.²⁷ Em modelos experimentais de sepse a inibição da ativação do NF- κ B inibe a expressão de múltiplos genes pró-inflamatórios, inibe a hipotensão arterial, melhora as disfunções miocárdica e vascular relacionadas à sepse, diminui a coagulação intravascular, inibe o influxo de neutrófilos nos tecidos, previne o aumento da permeabilidade vascular e a falência de múltiplos órgãos, além de aumentar a sobrevivência.²⁷

Enfim, a ativação do NF- κ B tem papel central na fisiopatologia do choque séptico. As bactérias e seus componentes ativam o NF- κ B através de diversas vias de sinalização que levam ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL- 1α , IL- 6, IL- 12, e IL- 18 que causam febre e alterações neurológicas além de ativarem o próprio

NF- κ B – e, desta forma, amplificam e perpetuam a resposta inflamatória. A ativação do NF- κ B leva ao aumento do fator tecidual, aumento do fator VIII e do PAI- 1 (*plasminogen-activator inhibitor type-1*) causando ativação das cascatas intrínseca e extrínseca de coagulação e defeitos na fibrinólise, o que leva à CIVD; a ativação do NF- κ B leva ao aumento da expressão da iNOS com produção excessiva do óxido nítrico e de prostaglandinas vasodilatadoras resultando em hipotensão arterial, depressão miocárdica e hiporresponsividade vascular. A ativação do NF- κ B causa, ainda, aumento da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, levando à ativação e infiltração de neutrófilos tecidos com produção de espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e enzimas proteolíticas, que causam injúria endotelial microvascular, aumento da permeabilidade endotelial e injúria de múltiplos órgãos.²⁷

1.3.5. Papel da enzima NO sintase endotelial (eNOS) na fisiopatologia da sepse e da IRA relacionada à sepse

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa, altamente hidrofóbica e facilmente difusível através de membranas biológicas. Apresenta meia-vida curta quando diluído (5 a 10 segundos) devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato, metabólitos estáveis do NO.³⁶

O NO tem afinidade por proteínas que contêm o grupo “heme”, como a enzima guanilato ciclase que, quando ativada, leva à formação do GMPc (guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato). O GMPc media ações como o

relaxamento vascular e miocárdico e inibe a agregação plaquetária. Por outro lado, o NO também pode reagir com o ânion superóxido e formar o peroxinitrito, potente oxidante com efeitos tóxicos em diversas moléculas.³⁶

O NO em células de mamíferos é derivado da conversão do aminoácido L-arginina proveniente da dieta à L-citrulina através da ação de uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS).³⁷

As enzimas óxido nítrico sintases (NOS) são fundamentais para o controle da biossíntese do NO. Existem três principais isoformas conhecidas das NOS: uma forma indutível - somente expressa após estimulação das células - expressa nos macrófagos e células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos como microrganismos invasores, e duas formas ditas constitutivas, que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio e nos neurônios. Essas formas são designadas iNOS, eNOS e nNOS, respectivamente.^{37,38}

Na verdade, há discordâncias quanto a estas nomenclaturas uma vez que o RNA mensageiro da iNOS foi encontrado constitutivamente em tecidos cardíacos e a eNOS pode ter sua expressão aumentada em algumas respostas inflamatórias. Sugere-se que estas isoformas possam apresentar características induzíveis ou constitutivas conforme os tecidos em que estão expressas.³⁸ A iNOS foi inicialmente caracterizada em macrófagos ativados mas também já foi descrita em diversos tipos celulares ativados, inclusive monócitos, neutrófilos, eosinófilos, hepatócitos, células do músculo liso vascular, miócitos, epitélio e células endoteliais sob condições normais. A

eNOS foi originalmente conhecida como responsável pela produção do fator relaxante derivado do endotélio e, além de ser expressa no endotélio vascular, encontra-se em plaquetas e cardiomiócitos.³⁸

Na sepse a iNOS é ativada pelo TNF- α , pelo IFN – gamma, pela interleucina – 1, pelo próprio LPS e por várias outras citocinas.³⁹ Diversos estudos experimentais têm demonstrado que há queda na atividade da eNOS durante a sepse.^{39, 40, 41} E foi demonstrado que camundongos *knock-out* para eNOS apresentam maior susceptibilidade à IRA no modelo LPS.²²

A inibição seletiva da atividade da iNOS durante a sepse pode aumentar a pressão arterial; mas a inibição não seletiva do NO, com conseqüente inibição da eNOS na sepse, pode acentuar a agregação plaquetária e a aderência de neutrófilos ao endotélio resultando em trombose e dano a tecido normal.^{39, 42} Apesar destas evidências o papel da eNOS na sepse ainda não está completamente definido.

1.4. Modelos animais de sepse

O conhecimento dos mecanismos da IRA relacionada à sepse avançou pouco nos últimos 50 anos. Alguns autores acreditam que isto ocorra, principalmente, devido à falta de informações histopatológicas, uma vez que raramente há indicação de biópsia renal em humanos sépticos com IRA. Na prática, contamos com os aumentos da creatinina sérica, com a

avaliação do débito urinário e da fração de excreção de sódio para tentar entender a fisiopatologia da IRA induzida pela sepse em humanos.

Com a finalidade de tentar superar estas limitações, o desenvolvimento de modelos animais permitiu a realização de experimentos que tentam elucidar o comprometimento de vários órgãos e sistemas na sepse.³⁰

Diversos modelos animais têm sido utilizados para estudar a sepse e a IRA relacionada à sepse e, dentre eles, os dois modelos mais frequentemente utilizados para o estudo da fisiopatologia da sepse são: o modelo de inflamação sistêmica induzida pelo lipopolissacarídeo (modelo LPS) e o modelo de sepse induzida pela ligadura e punção do ceco (modelo LPC).³⁴

O modelo LPC mimetiza diversos aspectos da sepse humana, como na sepse decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. O uso de antibióticos (ATB) e de expansão volêmica no modelo é semelhante ao tratamento oferecido a pacientes na UTI.^{34, 43, 44, 45} No modelo LPC podemos “ajustar” o grau de severidade da sepse através da extensão do ceco ligado ou através do tamanho e/ ou número de perfurações no ceco.³⁴ O modelo LPC apresenta padrão de citocinas inflamatórias na sepse muito semelhante ao que ocorre na sepse humana e, inclusive, o tratamento com anti- TNF- α não atenua a sepse neste modelo, semelhante ao que ocorre na sepse humana.^{34, 46}

No modelo LPC, a expansão volêmica iniciada no pós-operatório imediato, com a finalidade de repor as perdas ocorridas durante o ato operatório, promove uma fase hiperdinâmica que mimetiza a sepse humana.⁴⁷ O modelo LPS não apresenta fase hiperdinâmica e não reproduz adequadamente a sepse humana, em parte pela sua diferença na cinética e magnitude de resposta inflamatória.^{45, 48}

1.5. A eritropoietina e suas ações pleiotrópicas

A eritropoietina (EPO) é um hormônio de crescimento cuja principal função fisiológica é a indução da eritropoiese. No adulto a EPO é produzida por células intersticiais semelhantes ao fibroblasto no córtex renal, e em menor parte, também é produzida pelo fígado. Após sua produção a EPO é secretada nos capilares peritubulares e cai na circulação sistêmica.⁴⁹

A EPO tem sido utilizado há cerca de 20 anos no manejo da anemia associada à Insuficiência Renal Crônica (IRC). Além disso, também tem sido descrito seu uso no tratamento da anemia de pacientes com doenças malignas em tratamento com quimioterápicos, em pacientes sidéticos com anemia secundária ao uso da zidovudina, e nos casos de doação autóloga de sangue no manejo pré-operatório.⁵⁰

A produção de eritropoietina sintética, na década de 1980, trouxe uma importante mudança no manejo da anemia de pacientes com IRC e

praticamente eliminou a necessidade de transfusões sangüíneas entre estes pacientes.^{51, 52} Além disso, o uso da EPO no tratamento dos pacientes com IRC melhora significativamente a qualidade de vida, a capacidade para o trabalho e a tolerância ao exercício; restaura a função sexual e reduz a fadiga e a depressão.^{53, 54, 55} Há também evidências de que o tratamento com EPO diminui a velocidade de progressão da IRC.^{56, 57}

Estudos recentes têm demonstrado que além de sua atividade hematopoiética, a EPO apresenta também efeitos citoprotetores em diversas células e tecidos.^{50, 58, 59} A descoberta de que receptores da EPO são amplamente distribuídos em diversos tecidos, inclusive nas células glomerulares, mesangiais e tubulares epiteliais, tanto nos ratos e camundongos quanto nos homens, levou diferentes grupos a estudar a ação da EPO em diversos modelos de IRA.

Foi demonstrado que a EPO apresenta proteção renal em modelos de IRA secundária à isquemia/reperfusão e à nefrotoxicidade pela cisplatina.^{49, 50, 59} Além disso, o tratamento crônico com o análogo da EPO de ação prolongada, a darbapoetina – α , resultou na proteção da função renal em modelo de IRC (nephrectomia à 5/6), além de aumentar a sobrevivência dos ratos urêmicos.⁶⁰

Estes estudos demonstraram que além do estímulo da eritropoiese, a EPO também tem capacidade de reduzir apoptose, reduzir estresse oxidativo e peroxidação lipídica, aumentar a regeneração das células tubulares renais, aumentar a mobilização de células progenitoras endoteliais,

aumentar a regeneração vascular e a neoangiogênese, e aumentar a expressão e atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS); a EPO ainda atenua a diminuição da expressão das aquaporinas renais e dos transportadores de sódio em modelo de IRA isquêmica.^{50, 61, 62, 63, 64}

As ações anti-inflamatórias da EPO são bem conhecidas sobre diversos tecidos em vários modelos animais.⁵⁰ Em um estudo experimental, a EPO protegeu nervos periféricos da lesão por compressão através da inibição da ativação do NF- κ B.⁶⁵

Em modelo de endotoxemia induzida pelo LPS, a EPO, administrada trinta minutos antes da infusão do LPS, foi capaz de proteger a disfunção renal relacionada à sepse. Neste estudo, a proteção da função renal (medida pelo *clearance* de inulina dezesseis horas após indução da sepse) foi associada à ação anti estresse oxidativo da EPO. A ação anti-inflamatória da EPO neste estudo não ficou muito bem esclarecida uma vez que houve aumento dos níveis de TNF - α entre os animais sépticos, porém com queda não significativa entre os animais sépticos tratados com EPO. De forma semelhante, houve diminuição da infiltração de neutrófilos no tecido renal dos animais sépticos tratados com EPO, porém não de forma estatisticamente significativa.⁶⁶

Outro estudo avaliou a ação da EPO em dois modelos experimentais de sepse: na endotoxemia induzida pelo LPS (modelo LPS) e no modelo de ligadura e punção do ceco (modelo LPC). Neste estudo, no modelo LPS, os animais sépticos tratados com EPO apresentaram níveis de creatinina sérica

menores que os animais não tratados. A função renal não foi avaliada no modelo LPC. E a sobrevivência dos animais sépticos tratados com EPO foi maior que os não tratados, em ambos os modelos.⁶⁷

2. Objetivos

Os objetivos do nosso estudo são:

- 2.1. Avaliar os mecanismos da IRA relacionada à sepse, principalmente quanto à participação do NF- κ B e da eNOS.
- 2.2. Avaliar se a EPO tem ação protetora na IRA relacionada à sepse no modelo de ligadura e punção do ceco (LPC).

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais e protocolos de experimentos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica 12 (LIM 12) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Ratos Wistar machos com pesos entre 180 – 230g e cerca de 8 semanas de vida foram obtidos do biotério central da FMUSP e tiveram livre acesso a água e dieta padrão para ratos.

Nós utilizamos o modelo de LPC descrito por Holly MK *et al* (com algumas modificações) que utilizou antibiótico de largo espectro e ressuscitação volêmica com SF 0,9%.⁶⁸

3.2. Etapas

Com o objetivo de estudar os efeitos precoces e tardios da EPO sobre a IRA induzida pela sepse, dividimos o estudo em três etapas:

3.2.1. PRIMEIRA ETAPA – (Estudo precoce) realizada 24 horas após indução da sepse.

3.2.2. SEGUNDA ETAPA – (Estudo tardio) realizada 48 horas após indução da sepse.

3.2.3. TERCEIRA ETAPA – Análise de sobrevivência.

3.3. Grupos

Em cada etapa os animais foram divididos em 3 grupos:

3.3.1. Grupo controle.

3.3.2. Grupo LPC – Grupo ligadura e punção do ceco.

3.3.3. Grupo LPC+EPO – Grupo ligadura e punção do ceco tratado com eritropoietina.

3.4. Procedimento cirúrgico

No grupo controle, sob anestesia com tribromoetanol 2,5% (2,2,2 tribromoetanol, 99%), dose 250 mg/Kg, os animais foram submetidos a laparotomia abdominal com incisão longitudinal mediana de cerca de 3,5 cm e o ceco foi localizado e exposto. No grupo LPC, após localização e exposição do ceco, foi realizada ligadura do ceco com fio *nylon* 3.0 a cerca de 1,5 cm da extremidade do ceco. O ceco então foi puncionado duas vezes com jelco 14G e pressionado levemente para vazamento de pequena quantidade de fezes para dentro da cavidade abdominal. No grupo LPC+EPO, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento para indução da sepse porém receberam eritropoietina (Hemax®, Biosintética), via intra peritoneal, na dose de 4000 UI/Kg de peso corpóreo (diluída em 1 ml de SF 0,9%) 24 horas e 1 hora antes da LPC. Nos grupos controle e LPC, os animais receberam 1 ml de SF 0,9% 24 horas e 1 hora antes do procedimento cirúrgico.

A parede abdominal foi suturada em duas camadas (músculo e pele) com pontos simples utilizando-se fio *nylon* 4.0. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, os animais receberam SF 0,9% pré aquecido, via intra peritoneal, na dose de 25 ml/Kg de peso corpóreo.

Seis horas após a cirurgia todos os animais passaram a receber ATB de largo espectro Imipenem Cilastatina Sódica (Tienam – *Merck Sharp & Dohme*) e ressuscitação volêmica com SF 0,9% (25 ml/Kg de peso corpóreo), via subcutânea (SC). A partir deste momento passaram a receber ATB e SF 0,9% a cada 12 horas, via SC, até o sacrifício.

3.5. PRIMEIRA ETAPA: Estudo Precoce – 24 horas após LPC.

Na primeira etapa dividimos os animais em grupos controle (N = 5), grupo LPC (N = 7) e grupo LPC+EPO (N = 7).

Vinte e quatro horas após a indução da sepse foi realizada avaliação da função renal através do *clearance* de inulina, aferição direta da pressão arterial média (PAM) e avaliação da gasometria arterial com dosagem do hematócrito e do lactato arterial.



Figura 1. Gráfico ilustrativo da cronologia da primeira etapa

3.5.1. *Clearance* de inulina

Os ratos foram anestesiados com tiopental 50 mg/kg e submetidos à cateterização das duas veias jugulares com cateter PE60, da artéria femoral esquerda com cateter PE50 e da bexiga com cateter PE 240. Um *priming* de inulina (100mg/kg) foi administrado, com posterior infusão constante de inulina a uma velocidade de 0,04 ml/min. Após trinta minutos foi realizada coleta do sangue inicial. A urina foi coletada em três períodos de trinta minutos. Ao final do experimento, cerca de 10 ml de sangue do animal foi retirado para medir a concentração de inulina final e realizar as demais dosagens plasmáticas. Os plasmas obtidos eram desproteinizados em uma diluição de 1:11 de solução de ácido perclórico a 5% antes da dosagem da inulina por método espectrofotométrico. As amostras de urina coletadas foram diluídas em dois momentos: primeira diluição 1:11 em água destilada e a segunda diluição calculada a partir da concentração de inulina plasmática. A espectrofotometria foi usada para medir as concentrações de inulina. No cálculo da inulina, urinária ou plasmática, foi usado um fator de correção encontrado a partir da curva padrão de inulina, obtida por dosagens seriadas de diferentes concentrações de inulina pelo investigador direto do protocolo. O *clearance* de inulina foi calculado a partir da razão inulina urinária sobre a plasmática.

3.5.2. Aferição direta da pressão arterial média (PAM)

A aferição da PAM foi realizada no início experimento, logo após cateterização da artéria femural, através de manômetro de mercúrio.

3.5.3. Avaliação da gasometria arterial, do hematócrito e do lactato arterial

Amostras de sangue (de 0,2 ml cada) foram coletadas 24 horas após o procedimento cirúrgico, no início do experimento do *clearance* de inulina, e foram analisadas imediatamente após a coleta por aparelho de gasometria (*Radiometer*, Copenhagen, Dinamarca) para avaliação da gasometria arterial, lactato arterial e hematócrito.

3.6. SEGUNDA ETAPA: Estudo Tardio – 48 horas após LPC

Na segunda etapa repetimos os experimentos dividindo os animais em grupos controle (N = 7), LPC (N = 9) e LPC+EPO (N = 7).

Nesta etapa, com a finalidade de avaliar se a EPO seria capaz de manter no período mais tardio um possível efeito renoprotetor, foi realizada avaliação da função renal através do *clearance* de creatinina. Foram realizados estudos em gaiolas metabólicas e nova aferição direta da PAM 48 horas após o procedimento cirúrgico. Também foram realizados estudos de imunohistoquímica e *Western blot* em amostras de tecido renal adquiridos 48h após indução da sepse.

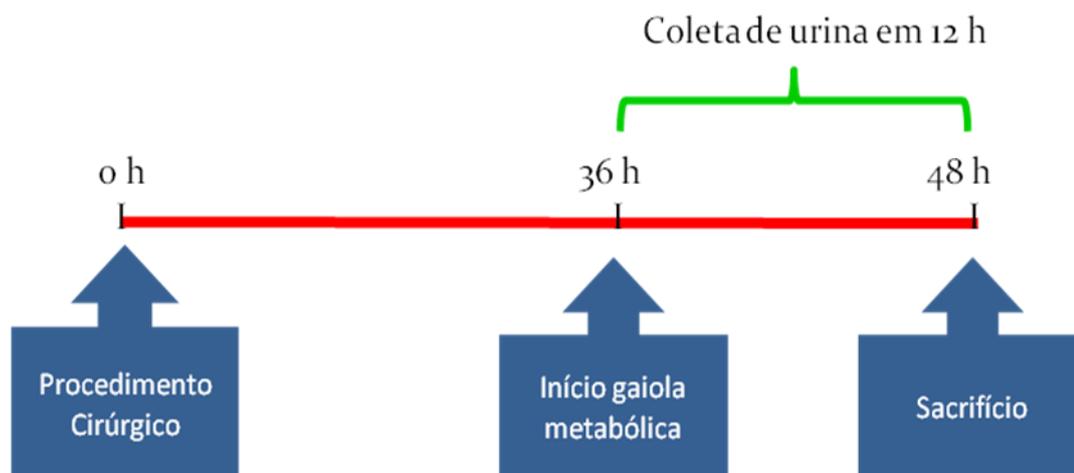


Figura 2. Gráfico ilustrativo da cronologia da segunda etapa

3.6.1. Clearance de creatinina e aferição direta da pressão arterial média

Trinta e seis horas (36 horas) após a indução da sepse os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas por um período de 12 horas (período noturno, respeitando-se o ritmo biológico dos roedores que são animais de hábito noturno). Durante este período de 12 horas foi realizada coleta de urina em frascos individualmente pesados e identificados para cada animal. Após o período de coleta de urina (e completadas 48 horas após indução da sepse), os animais foram retirados das gaiolas metabólicas e os frascos de urina novamente pesados. O volume urinário em 12 horas para cada animal foi mensurado pelo resultado da diferença entre o peso final do frasco de urina e o peso inicial do mesmo frasco.

3.6.2. Aferição direta da pressão arterial média 48 horas após LPC

Após os animais serem retirados das gaiolas metabólicas 48 horas depois do procedimento cirúrgico, os mesmos foram anestesiados com tiopental 50 mg/kg e submetidos a nova laparotomia abdominal sob a incisão cirúrgica prévia após retirada dos pontos cirúrgicos. Após punção e cateterização da aorta abdominal com cateter PE-60, foi realizada aferição

direta da PAM e posterior coleta de 1 ml de sangue para dosagem de creatinina e sódio.

3.6.3. Quantificação da creatinina e do sódio nas amostras de sangue e urina

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de amostras de urina de 12 horas para determinação da creatinina e subsequente cálculo da taxa de filtração glomerular observada 48 h após a indução da sepse. A análise da creatinina nas amostras de sangue e urina foi realizada pelo método colorimétrico utilizando ácido pícrico. A quantificação do sódio, tanto nas amostras de sangue quanto nas amostras de urina, foi realizada por fotometria de chama (*Instrumentation Laboratory*, modelo 143, Lexington, MA, EUA).

3.6.4. Coleta do tecido renal para análise histológica, imunohistoquímica e para *Western blot*

Através do catéter inserido na aorta abdominal os órgãos foram perfundidos com PBS (NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4) para lavagem do leito vascular. Em seguida, o rim direito foi isolado, retirado e, após descapsulado, foi dividido em duas metades. Uma parte do tecido renal

foi imerso em solução de *methacarn* (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) durante 24 horas e após este período, a solução foi substituída por álcool 70%. A outra metade do rim foi prontamente separada em córtex e medula sobre placa de vidro com temperatura fria e, após, rapidamente mergulhada em nitrogênio líquido, e posteriormente estocada a -70° C para estudos de *Western blot*. Após a remoção do rim direito, foi realizada a infusão de solução fixadora (paraformaldeído 4%). Após a perfusão com paraformaldeído 4%, um fragmento do rim esquerdo foi retirado e mantido em solução de paraformaldeído 4% por mais duas horas e, em seguida, foi pós-fixado em solução de Bouin por quatro horas. Depois esta solução foi trocada por solução de etanol a 70%. Posteriormente o tecido renal foi embebido em parafina, cortado em secções de 4 µm, desparafinado e submetido à coloração de tricrômio de Masson ou à reação de imunohistoquímica.⁶⁹

3.6.5. Imunohistoquímica

Os cortes de tecido renal foram incubados com anticorpo anti - NF- κB (*Santa Cruz Biotechnology Inc.*, CA, EUA), na diluição de 1/80, durante a noite, à temperatura de 4°C e com anticorpo anti-ED1 (*AbD Serotec*, Oxford, Reino Unido), na diluição de 1/1000, durante a noite, à temperatura de 4°C. Os anticorpos utilizados foram: anticorpo policlonal anti - NF- κB p65 (SC – 109, *Santa Cruz Biotechnology Inc.*, CA, EUA) e anticorpo monoclonal anti –

ED1 (*mouse anti rat* CD68 clone ED1, *AbD Serotec*, Oxford, Reino Unido). O anticorpo anti - NF- κ B p65 reconhece a subunidade p65 do NF- κ B, um potente domínio de ativação da transcrição. Este anticorpo liga-se seletivamente à forma ativada do NF- κ B.^{69, 70, 71} O anticorpo anti- ED1 reconhece antígeno citoplasmático nos monócitos e maior parte dos macrófagos. Apenas as células mononucleares do sistema fagocítico são positivas para este anticorpo.^{69, 72} O produto da reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (*Vector Laboratories*, CA, EUA) e a cor desenvolvida com 3,3-diaminobenzidina e cloreto de níquel 8% na presença de água oxigenada. A contracoloração foi feita com *Methyl Green*. Os cortes foram examinados sob microscopia de luz em um aumento de 400 X.

3.6.6. Avaliação dos resultados de imunohistoquímica

A avaliação dos resultados da imunorreação para NF- κ B foi realizada através de escores que refletem a extensão da área do córtex renal marcado, tendo sido atribuído um escore de 0 a 4. O escore 0, equivale entre 0 a 5% do campo marcado; o escore 1, entre 5 e 25%; o escore 2, entre 25 e 50%; o escore 3, entre 50 e 75% e o escore 4, entre 75 e 100%. Foram analisados de 30 a 50 campos de cada córtex renal estudado e determinado um escore médio para cada rato.⁶⁹

Para se obter os números médios de células ED1 positivas no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal, 30 campos de 0,245 mm²

cada foram avaliados e foram realizadas contagens médias das células ED1 positivas em cada rim estudado.⁶⁹

3.6.7. Coleta de tecido renal para estudos de *Western blot*

Os animais foram anestesiados e os rins foram removidos após a perfusão. A cápsula renal foi retirada e em seguida foi realizada a separação do córtex e medula renal. Os tecidos renais foram imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido e estocados a -70° C para estudos de *Western Blot*.

3.6.8. Extração de proteínas para *Western blot*

Os rins congelados dos animais foram homogeneizados em uma solução de K-Hepes (200mM Mannitol, 80mM Hepes, 41mM KOH; pH 7,5) contendo inibidores de proteases (*Cocktail Protease Inhibitor*, *Sigma Chemical Company*, St. Louis, MO). O homogenato foi então centrifugado (2000 g) por 15 min a 4°C para remoção das células e resíduos celulares. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford.

3.6.9. Western blot

As amostras de proteínas foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida. Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, os *blots* foram tratados com leite em pó desnatado 5% diluído em PBS-T (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0.1% Tween20, pH 7,5) por 1 hora e incubados com anticorpo específico para eNOS, *overnight*, na diluição 1: 2000 (*BD Transduction Laboratories*, Lexington, KY, EUA). O anticorpo utilizado foi o anticorpo monoclonal anti-eNOs/NOS tipo III (*BD Transduction Laboratories*, Lexington, KY, EUA). A marcação foi feita através da peroxidase (*HRP*)-conjugated secondary antibody (anti-mouse 1:2000, Sigma) usando sistema de quimioluminescência (ECL, Amersham). A normatização foi feita com a nova hibridização das membranas com o anticorpo para actina (Sigma).

3.6.10. Semi-quantificação das proteínas

As bandas obtidas nos filmes foram digitalizadas no sistema *Image Master VDS* (*Pharmacia Biotech*) e em seguida foi realizada a densitometria. Os resultados da análise densitométrica das bandas foram normatizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização com a actina.

3.6.11. Análise histológica e morfométrica

Os cortes de 4 μm de espessura de tecido renal obtidos dos animais controles e experimentais foram corados com tricrômio de Masson para análise do comprometimento túbulo-intersticial, avaliando-se a área intersticial relativa do córtex renal desses animais.

Foram realizados estudos de morfometria para avaliação da expansão da área intersticial. As imagens obtidas pela microscopia óptica foram captadas por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um analisador de imagens (QWin; Leica, Wetzlar, Alemanha). Foram analisados 20 campos medindo 37.000 μm^2 de cada animal e avaliada a fração percentual do córtex ocupado pelo interstício. Em seguida foi determinada a porcentagem da área intersticial em relação a cada campo, excluindo-se os vasos e glomérulos.

3.7. TERCEIRA ETAPA: Análise de Sobrevida

Nesta etapa realizamos a análise de sobrevida. Os experimentos foram repetidos e os animais divididos em grupo controle (N = 9), grupo LPC (N = 9) e grupo LPC+EPO (N = 7).

Seis horas após o procedimento cirúrgico os animais passaram a receber ATB e expansão volêmica com SF 0,9% e a partir deste momento passaram a ser avaliados quanto à sobrevida. Deste momento em diante, os animais passaram a ser re-avaliados a cada 6 – 12 horas até completar 60 horas após a cirurgia. Sessenta horas após a cirurgia todos os animais que continuavam vivos foram sacrificados com dose excessiva de anestésico.

3.8. Análise estatística

Os dados estão expressos em média \pm erro padrão. Diferenças entre as médias dos múltiplos parâmetros foram analisadas pelo método One-Way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Para as curvas de sobrevida utilizamos o teste Log-Rank. O programa estatístico utilizado foi o GraphPrism 3.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

**4.1. Resultados da PRIMEIRA ETAPA:
Estudo Precoce – 24 horas após
LPC**

4.1.1. Resultados gerais da PRIMEIRA ETAPA (Estudo Precoce)

Na primeira fase do estudo observamos que a EPO foi capaz de proteger a função renal durante a sepse, além de melhorar a anemia relacionada à sepse, a pressão arterial, a acidose metabólica e a microperfusão (avaliada pela dosagem do lactato arterial), conforme tabela a seguir:

Tabela 1. Resultados gerais da PRIMEIRA ETAPA (Estudo Precoce).

Grupo	Controle	LPC	LPC+EPO
<i>Clearance</i> de Inulina (ml/min/100 _g de rato)	0,82 ± 0,04	0,43 ± 0,08 ^{a, b}	0,99 ± 0,12
Ht (%)	43,0 ± 1,0	34,4 ± 2,5 ^{e, f}	41,4 ± 2,0
PAM (mmHg)	112 ± 2,5	74 ± 7,5 ^{c, d}	99 ± 2,3
Bicarbonato (mEq/L)	26 ± 1,3	21 ± 1,4 ^{e, d}	27 ± 1,0
BE	1,5 ± 0,5	-2,3 ± 1,8 ^{e, d}	3,2 ± 0,7
pH	7,44 ± 0,01	7,30 ± 0,12	7,44 ± 0,5
Lactato (mmol/L)	1,4 ± 0,6	4,3 ± 2,0 ^{a, d}	2,1 ± 1,1

^a p<0,01 vs. control; ^b p<0,001 vs. LPC+EPO; ^c p<0,001 vs. control; ^d p<0,01 vs. LPC+EPO; ^e p<0,05 vs. control; ^f p<0,05 vs. LPC+EPO

4.1.2. Efeito da EPO sobre o *clearance* de inulina 24 horas após indução da sepse

Como esperado, o *clearance* de inulina foi bastante reduzido entre os animais sépticos quando comparados com os animais não sépticos (LPC $0,43 \pm 0,08$ vs. controle: $0,83 \pm 0,04$ g ml/min/100_g de rato, $p < 0,01$). Os animais sépticos tratados com EPO (LPC+EPO) apresentaram *clearance* de inulina significativamente maior do que os ratos sépticos que não receberam EPO (grupo LPC): CLP + EPO $0,99 \pm 0,12$ vs. CLP $0,43 \pm 0,08$ ml/min/100_g de rato; $p < 0,001$. Não houve diferença entre o grupo CLP+EPO e o grupo controle (Tabela 1, Gráfico 1).

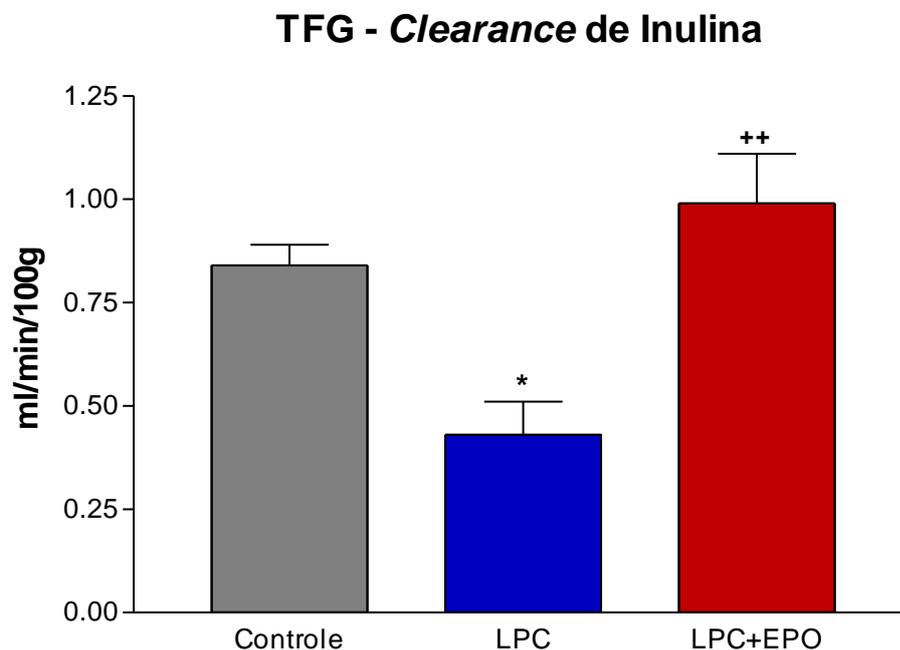


Gráfico 1. Taxa de filtração glomerular (TFG) avaliada após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,01$ (vs. Controle); ** $p < 0,001$ (vs. LPC).

4.1.3. Efeito da EPO sobre o hematócrito 24 horas após indução da sepse

Houve queda estatisticamente significativa do hematócrito entre os animais sépticos 24 horas após indução da sepse (controle $43 \pm 1,0\%$ vs. LPC $34,4 \pm 2,5\%$; $p < 0,05$). O tratamento com EPO preveniu a queda do hematócrito no grupo LPC+EPO (LPC $34,4 \pm 2,5\%$ vs. LPC+EPO $41,4 \pm 2,0\%$; $p < 0,05$) que apresentou valores de hematócrito semelhantes aos do grupo controle (LPC+EPO $41,4 \pm 2,0\%$ vs. controle $43 \pm 1,0\%$; $p > 0,05$). (Tabela 1, Gráfico 2).

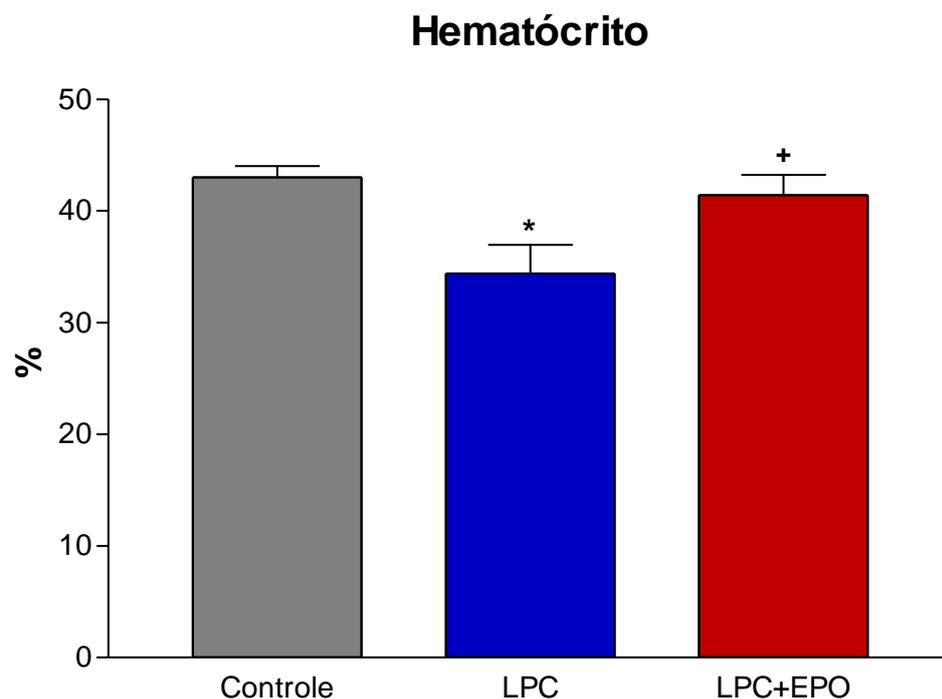


Gráfico 2. Hematócrito plasmático avaliado após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ (vs. Controle); + $p < 0,05$ (vs. LPC).

4.1.4. Efeito da EPO sobre a pressão arterial média (PAM) 24 horas após indução da sepse

O grupo LPC apresentou queda significativa da PAM 24 horas após indução da sepse (LPC $74 \pm 7,5$ vs. controle $112 \pm 2,5$ mmHg; $p < 0,001$). O tratamento com EPO foi capaz de proteger os animais sépticos da hipotensão (LPC $74 \pm 7,5$ vs. LPC+EPO $99 \pm 2,3$ mmHg; $p < 0,01$) e o grupo LPC+EPO manteve níveis pressóricos semelhantes aos do grupo controle. (Tabela 1, Gráfico 3).

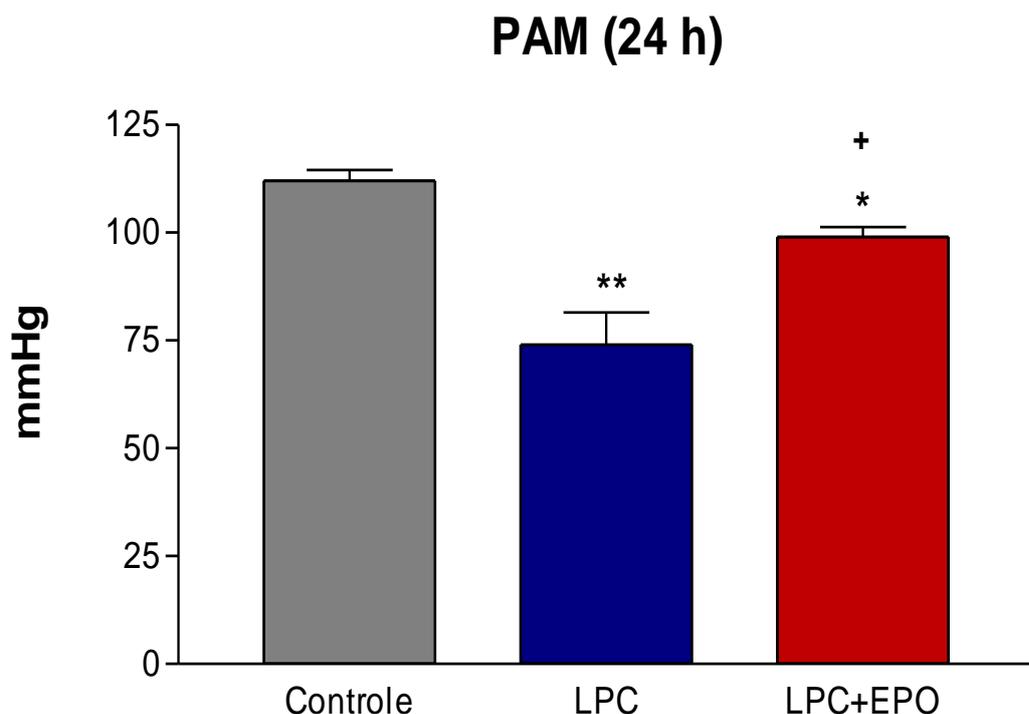


Gráfico 3. Pressão arterial média (PAM) avaliada após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p > 0,05$ (vs. Controle); ** $p < 0,001$ (vs. Controle); + $p < 0,01$ (vs. LPC).

4.1.5. Efeito da EPO sobre a acidose metabólica 24 horas após indução da sepse

Os animais do grupo LPC apresentaram queda significativa dos níveis de bicarbonato na gasometria arterial (LPC $21 \pm 1,4$ vs. controle $26 \pm 1,3$ mEq/l; $p < 0,05$). Os animais sépticos que receberam tratamento com EPO (LPC+EPO) apresentaram níveis de bicarbonato mais elevados que o grupo LPC (LPC $21 \pm 1,4$ vs. LPC+EPO $27 \pm 1,0$ mEq/l; $p < 0,01$), com valores semelhantes aos do grupo controle (Tabela 1, Gráfico 4).

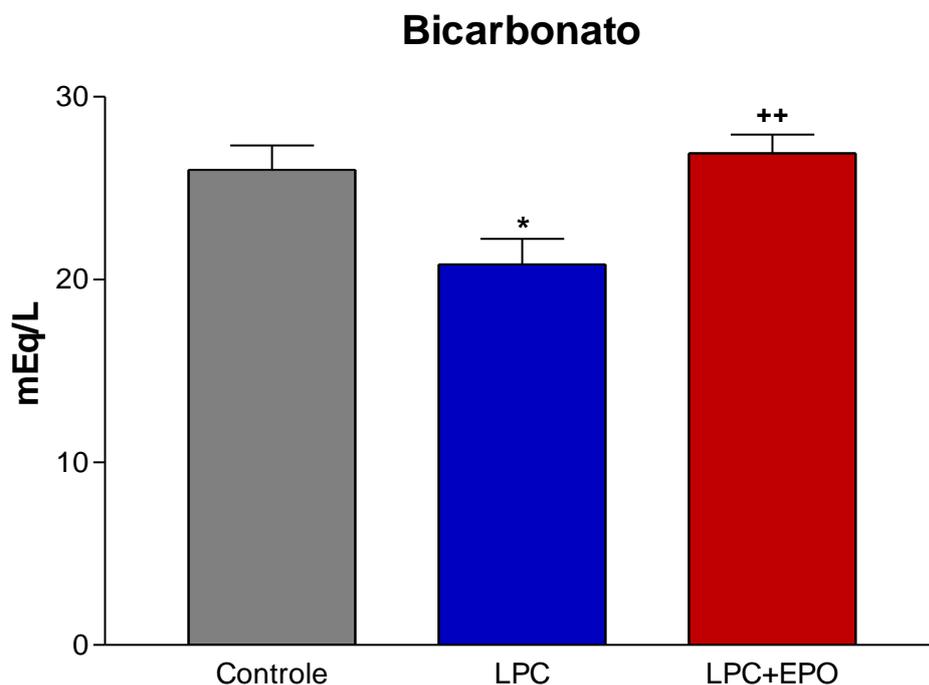


Gráfico 4. Bicarbonato plasmático avaliado após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ (vs. Controle); ** $p < 0,01$ (vs. LPC).

Entre os animais sépticos houve aumento no déficit de bases (LPC - $2,3 \pm 1,8$ vs. controle $1,5 \pm 0,5$; $p < 0,05$) e o tratamento com EPO foi capaz de recuperar este evento (LPC - $2,3 \pm 1,8$ vs. LPC+EPO $3,2 \pm 0,7$; $p < 0,01$) (Tabela 1).

No entanto, não houve diferença estatística entre os valores de pH nos três grupos: controle $7,44 \pm 0,01$; LPC $7,30 \pm 0,12$; LPC+EPO $7,44 \pm 0,5$. (Tabela 1, Gráfico 6).

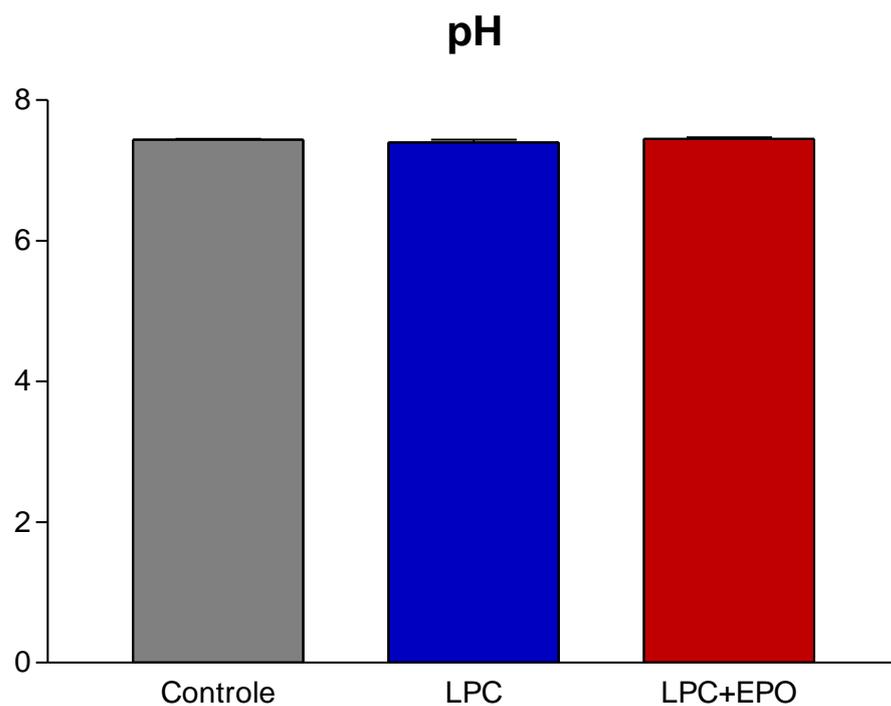


Gráfico 6. pH plasmático avaliado após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.1.6. Efeito da EPO sobre o lactato arterial 24 horas após indução da sepse

Os animais sépticos apresentaram elevação importante nos níveis de lactato arterial com valores médios de lactato arterial cerca de 3 vezes maior que os valores dos animais do grupo controle (LPC $4,3 \pm 2,0$ vs. controle $1,4 \pm 0,6$ mmol/L; $p < 0,01$). O tratamento com EPO preveniu o aumento do lactato arterial (LPC $4,3 \pm 2,0$ vs. LPC+EPO $2,1 \pm 1,1$ mmol/L; $p < 0,01$) e o grupo LPC+EPO apresentou valores médios de lactato arterial semelhantes aos do grupo controle (Tabela 1, Gráfico 8).

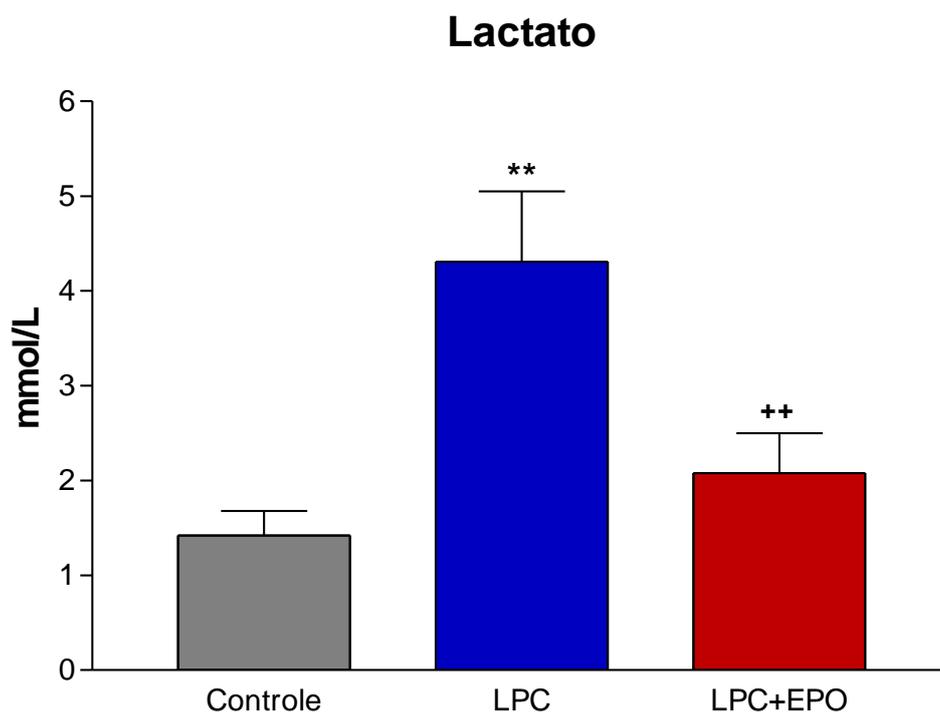


Gráfico 8. Lactato plasmático avaliado após 24 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ (vs. Controle); ** $p < 0,01$ (vs. LPC).

4.2. Resultados da SEGUNDA ETAPA: Estudo Tardio – 48 horas após LPC

4.2.1. Resultados gerais da SEGUNDA ETAPA (Estudo Tardio)

Na segunda fase do estudo observamos que a EPO foi capaz de manter proteção da função renal 48 horas após indução da sepse, além de manter a melhora hemodinâmica mesmo numa fase mais tardia da sepse. Quanto à função tubular, no nosso estudo, a EPO não modificou a fração de excreção de sódio (FENa) que está elevada na sepse. Alguns resultados desta etapa sugerem que a EPO possa apresentar ações anti-inflamatórias além de induzir o aumento da expressão de eNOS no tecido renal conforme tabela a seguir:

Tabela 2. Resultados gerais da SEGUNDA ETAPA (Estudo Tardio)

Grupo	Controle	LPC	LPC+EPO
Clearance Creatinina (ml/min/100 _g de rato)	1.14 ± 0,1	0.56 ± 0,1 ^{c, b}	0,98 ± 0,08
FENa (%)	0,15 ± 0,02	0,55 ± 0,1 ^{a, c}	0,75 ± 0,23
PAM (mmHg)	109,2 ± 3,0	76,25 ± 7,5 ^{a, f}	97,5 ± 3,0
Área intersticial relativa (%)	5,75 ± 0,86	11,6 ± 0,88 ^{b, c}	4,4 ± 0,43
Células ED-1 (células positivas/0,245mm ²)	7,32 ± 0,74	23,20 ± 3,71 ^{b, c}	7,48 ± 0,82
Escore para NFκB	0,67 ± 0,064	1,31 ± 0,08 ^{b, c}	0.8 ± 0.09
eNOS (%)	93.33 ± 3.33	28.33 ± 6.0 ^{b, c}	90.0 ± 5.77

^a p<0,01 vs. control; ^b p<0,001 vs. LPC+EPO; ^c p<0,001 vs. control; ^d p<0,01 vs. LPC+EPO; ^e p<0,05 vs. control; ^f p<0,05 vs. LPC+EPO

4.2.2. Efeito da EPO sobre o *clearance* de creatinina 48 horas após indução da sepse

Como esperado, o *clearance* de creatinina permaneceu alterado entre os animais sépticos quando comparados com os animais não sépticos 48 horas após indução da sepse (LPC $0.56 \pm 0,1$ vs. controle $1.14 \pm 0,1$ g ml/min/100_g de rato, $p < 0,001$). Os animais sépticos tratados com EPO (LPC+EPO) apresentaram *clearance* de creatinina significativamente maior do que os ratos sépticos que não receberam EPO (grupo LPC): CLP + EPO $0,98 \pm 0,08$ vs. CLP $0,56 \pm 0,1$ ml/min/100_g de rato; $p < 0,001$. Não houve diferença entre o grupo CLP+EPO e o grupo controle (Tabela 2, Gráfico 9).

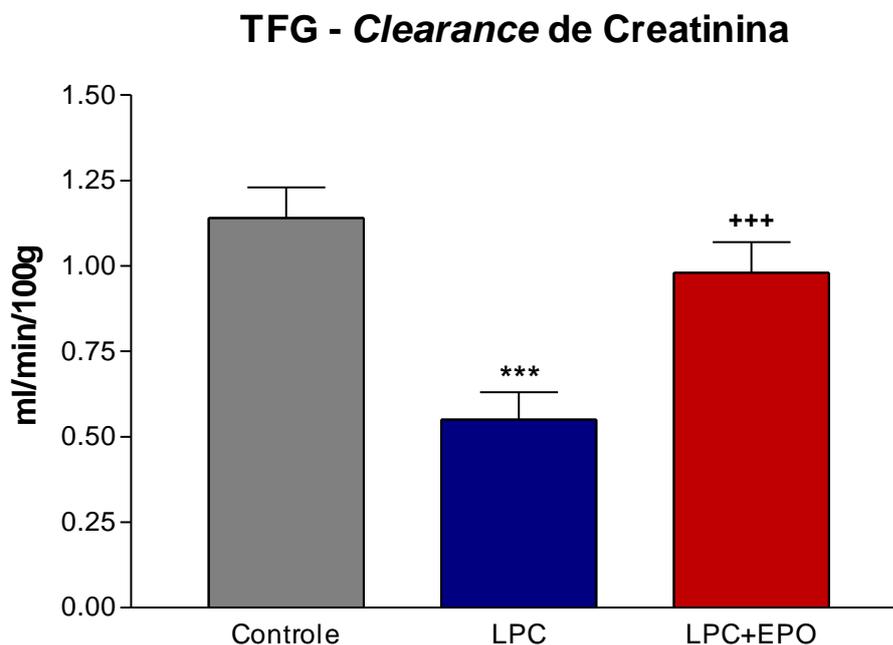


Gráfico 9. Taxa de filtração glomerular (TFG) avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ (vs. Controle); *** $p < 0,001$ (vs. LPC).

4.2.3. Efeito da EPO sobre a fração de excreção de sódio 48 horas após indução da sepse

Na sepse houve aumento da FENa e, no nosso estudo, a EPO não modificou a fração de excreção de sódio. Não houve diferença estatística entre o grupo LPC e o grupo LPC+EPO (controle $0,15 \pm 0,02$; LPC $0,55 \pm 0,1$; LPC+EPO $0,75 \pm 0,23\%$) (Tabela 2, Gráfico 10).

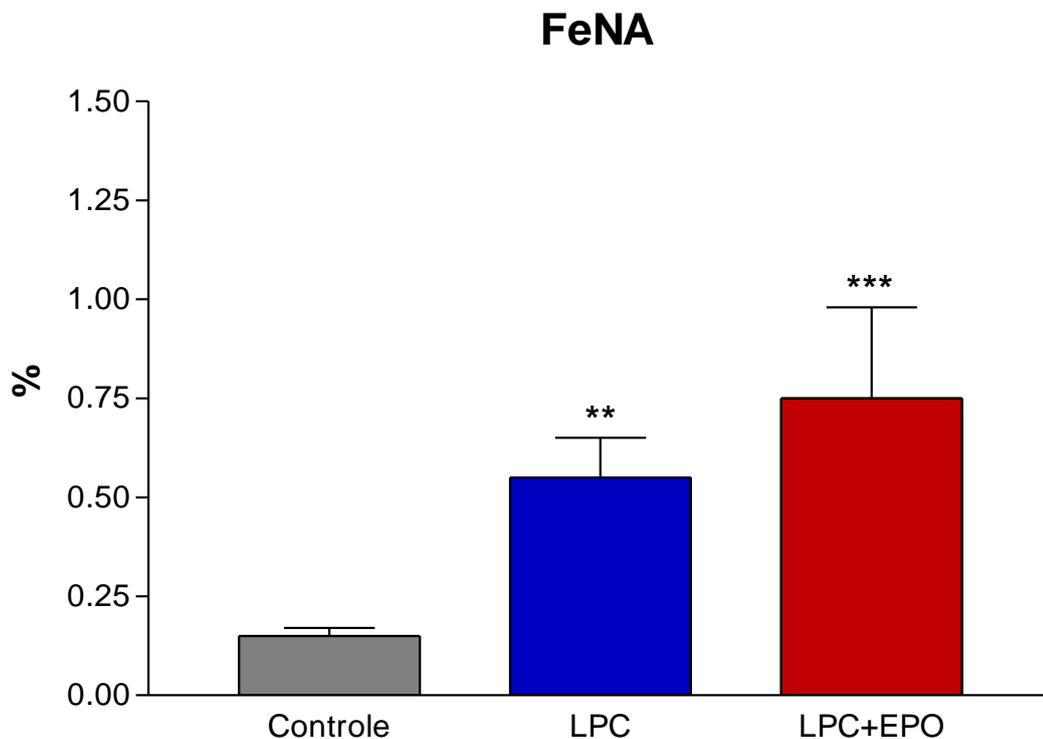


Gráfico 10. Fração de excreção de sódio (FENa) avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ (vs. Controle); *** $p < 0,001$ (vs. Controle).

4.2.4. Efeito da EPO sobre a pressão arterial média (PAM) 48 horas após indução da sepse

O grupo LPC manteve queda significativa da PAM 48 horas após indução da sepse (LPC $76,25 \pm 7,5$ vs. controle $109,2 \pm 3,0$ mmHg; $p < 0,01$). O tratamento com EPO foi capaz de proteger os animais sépticos da hipotensão (LPC $76,25 \pm 7,5$ vs. LPC+EPO $97,5 \pm 3,0$ mmHg; $p < 0,05$) e o grupo LPC+EPO manteve níveis pressóricos semelhantes aos do grupo controle (Tabela 2, Gráfico 11).

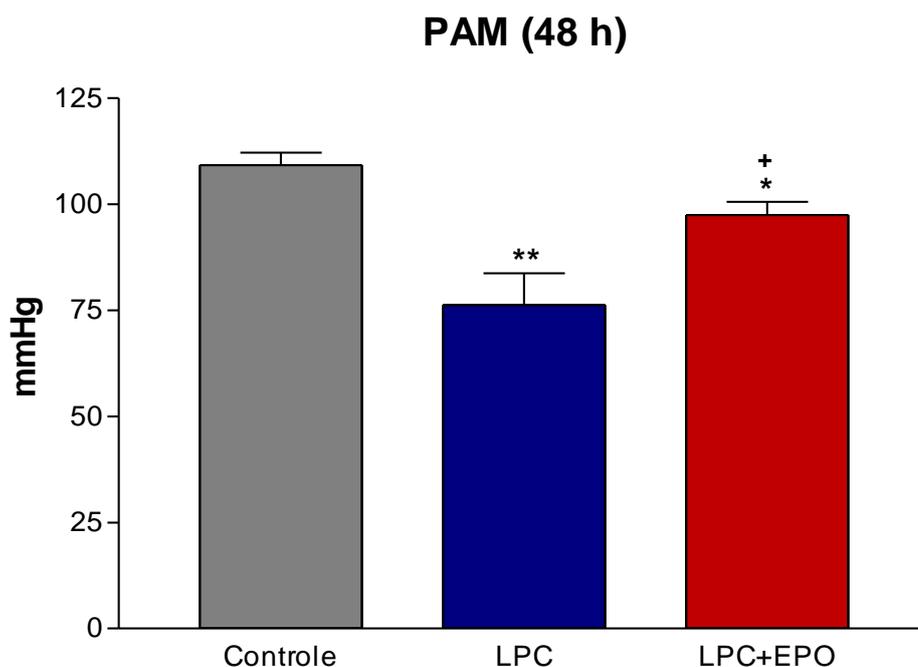


Gráfico 11. Pressão arterial média (PAM) avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p > 0,05$ (vs. Controle); ** $p < 0,01$ (vs. Controle); + $p < 0,05$ (vs. LPC).

4.2.5. Efeito da EPO sobre a área intersticial relativa (AIR) 48 horas após indução da sepse

No nosso modelo encontramos aumento importante da AIR 48 horas após indução da sepse (LPC $11,6 \pm 0,88$ vs. controle $5,75 \pm 0,86$ %; $p < 0,001$). O tratamento com EPO foi capaz de corrigir o aumento da AIR 48 horas após indução da sepse (LPC $11,6 \pm 0,88$ vs. LPC+EPO $4,4 \pm 0,43$ %; $p < 0,001$) (Tabela 2, Gráfico 12, Figura 3).

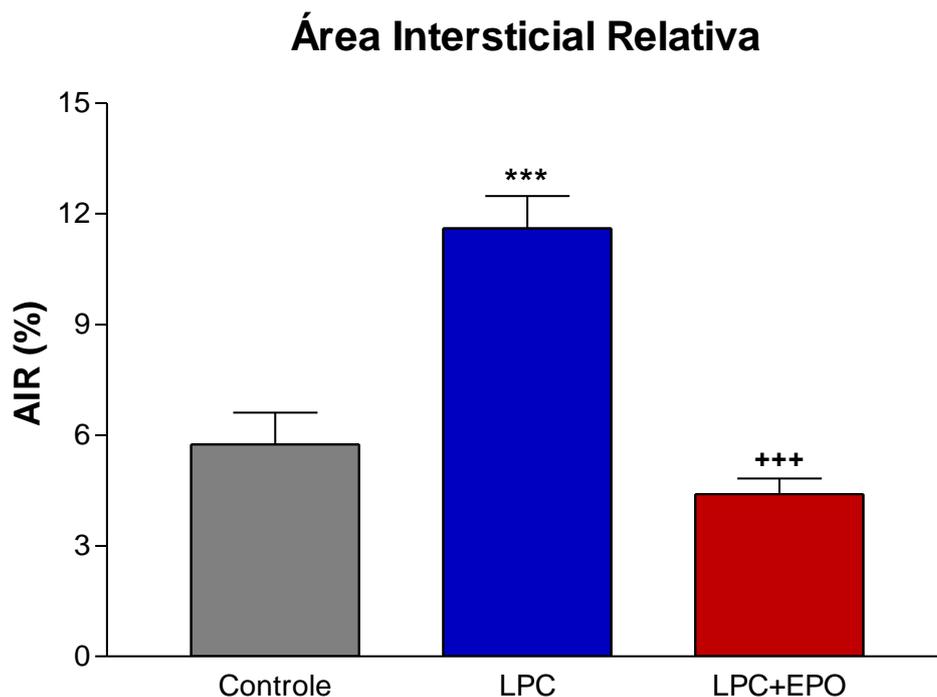


Gráfico 12. Porcentagem da área intersticial relativa (AIR) do córtex renal avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ (vs. Controle); +++ $p < 0,001$ (vs. LPC).

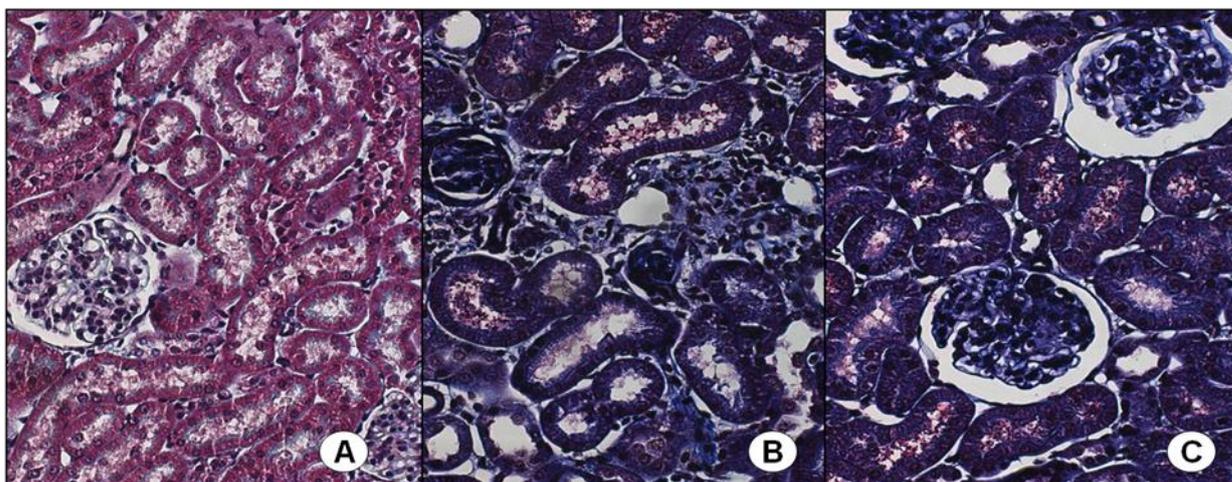


Figura 3. Fotomicrografias de cortes histológicos de córtex renal corados com Tricrômio de Masson de um rato controle (A) e de ratos sacrificados 48h após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) (B) ou LPC+EPO (C).

4.2.6. Efeito da EPO sobre o número de células ED1 positivas no tecido renal 48 horas após indução da sepse

No nosso modelo o aumento da área intersticial relativa poderia estar relacionado, em parte, com um aumento de infiltrado inflamatório no tecido renal. Para testarmos esta hipótese, realizamos a imunolocalização de células ED1 positivas para avaliarmos a infiltração de macrófagos no tecido renal.

De fato, após a sepse encontramos um aumento importante das células ED1 positivas no compartimento túbulo-intersticial quando comparadas com o grupo controle (LPC $23,20 \pm 3,71$ vs. controle $7,32 \pm 0,74$ células positivas/ $0,245 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$). O tratamento com EPO reduziu de forma significativa o número de células postivas (LPC $23,20 \pm 3,71$ vs. LPC+EPO $7,48 \pm 0,82$ células positivas/ $0,245 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$) para números semelhantes aos do grupo controle.

(Tabela 2, Gráfico 13, Figura 4).

Células ED1 positivas

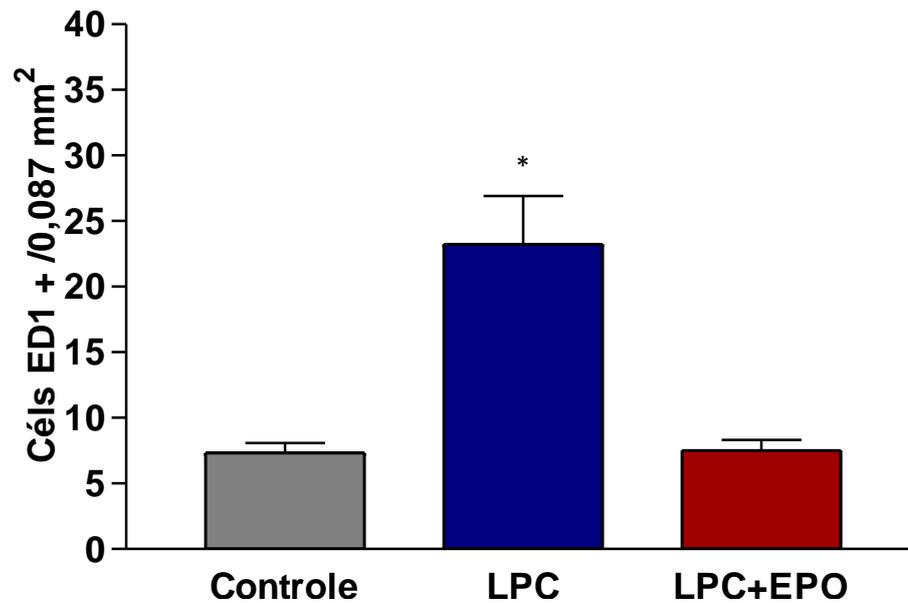


Gráfico 13. Número de células ED-1 positivas no córtex renal avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.001$ vs. Controle e vs. LPC+EPO.

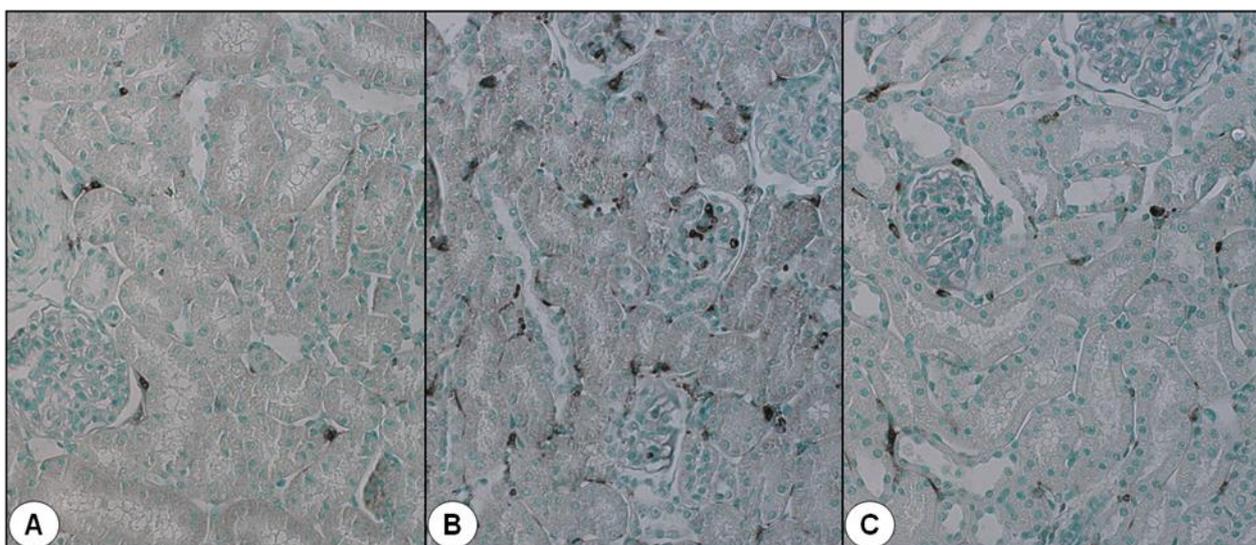


Figura 4. Imunolocalização de células ED-1 positivas (macrófagos e monócitos) em cortes de córtex renal de um rato controle (A) e de ratos sacrificados 48h após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) (B) ou LPC+EPO (C).

4.2.7. Efeito da EPO sobre a expressão do NF- κ B no tecido renal 48 horas após indução da sepse

Encontramos aumento importante da expressão do NF- κ B no córtex renal de animais sépticos quando comparados aos controles (controle escore $0,67 \pm 0,06$ vs. LPC $1,32 \pm 0,08$; $P < 0,001$). Os animais sépticos que receberam tratamento com EPO apresentaram diminuição da expressão do NF- κ B para valores semelhantes aos do grupo controle (LPC $1,32 \pm 0,08$ vs. LPC+EPO $0,81 \pm 0,09$; $p < 0,001$) (Tabela 2, Gráfico 14, Figura 5).

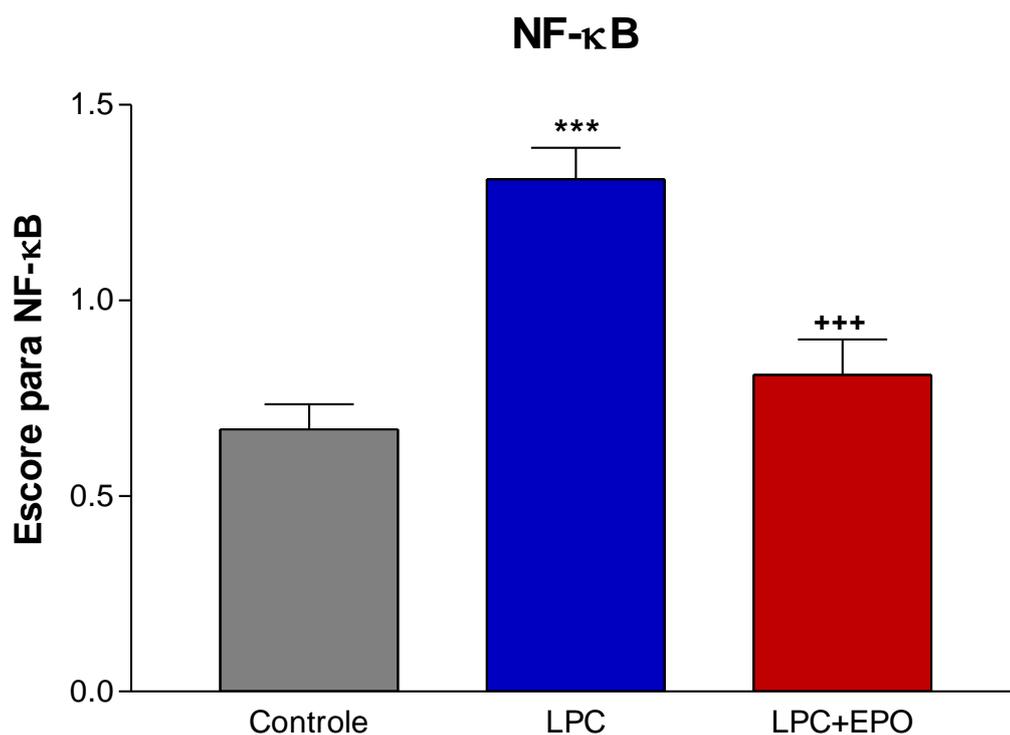


Gráfico 14. Escore para NF- κ B no compartimento túbulo-intersticial (CTI) do córtex renal de ratos controles e de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com eritropoetina sacrificados 48h após as intervenções cirúrgicas. Os dados são expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ (vs. Controle) *** $p < 0,001$ (vs. LPC).

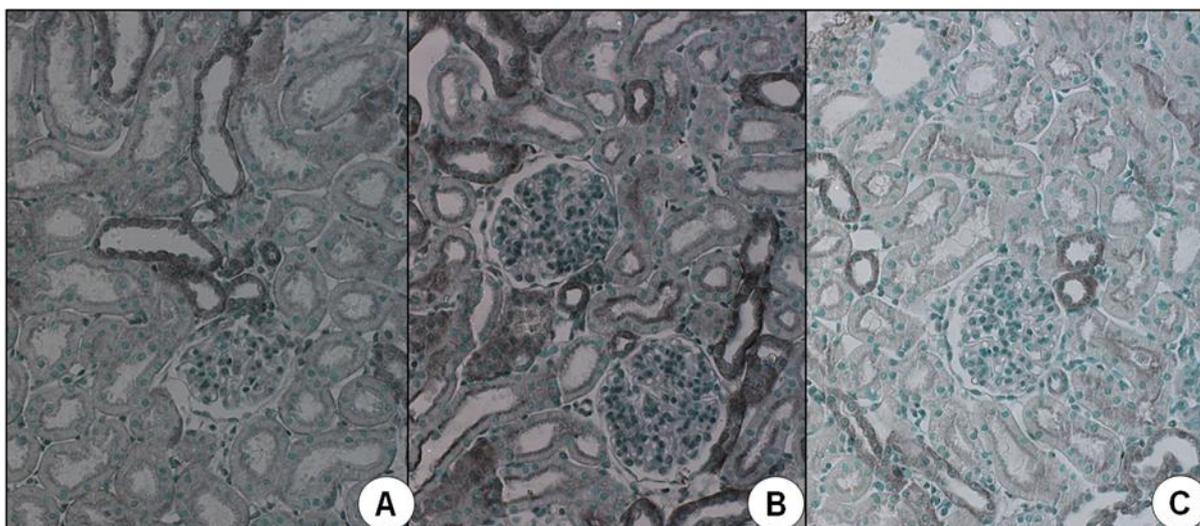


Figura 5. Imunolocalização do NF- κ B no córtex renal de um rato controle (A) e de ratos sacrificados 48 h (B e C) após a cirurgia de LPC tratados (C) ou não (B) com EPO.

4.2.8. Efeito da EPO sobre a expressão da enzima NO sintase endotelial no tecido renal 48 horas após indução da sepse

Os animais sépticos apresentaram diminuição importante da expressão da eNOS no tecido renal 48 horas após indução da sepse (LPC $28.3 \pm 6\%$ vs. controle $93 \pm 3.3\%$; $p < 0,001$). O tratamento com EPO previne a redução da expressão de eNOS na sepse e os animais sépticos tratados com EPO apresentaram valores de eNOS semelhantes aos do grupo controle (LPC $28.3 \pm 6\%$ vs. LPC+EPO $90 \pm 6.0\%$; $p < 0,001$) (Tabela 2, Gráfico 15).

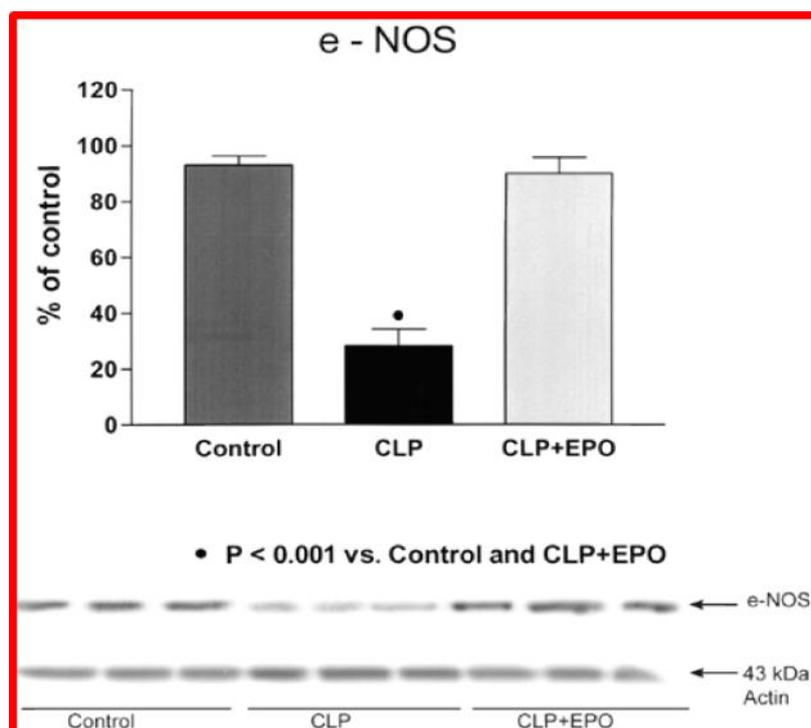


Gráfico 15. Análise densitométrica para e-NOS citoplasmático no córtex renal avaliada após 48 horas em ratos controles e em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (LPC) tratados (LPC+EPO) ou não (LPC) com EPO. Os dados são expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ (vs. Controle); *** $p < 0,001$ (vs. LPC).

4.3. Resultado da TERCEIRA ETAPA: Análise de Sobrevida

4.3. Resultado da Terceira Etapa: Análise de Sobrevida

Os animais sépticos tratados com EPO apresentaram sobrevida maior que aqueles que não receberam tratamento ($p = 0,0018$).

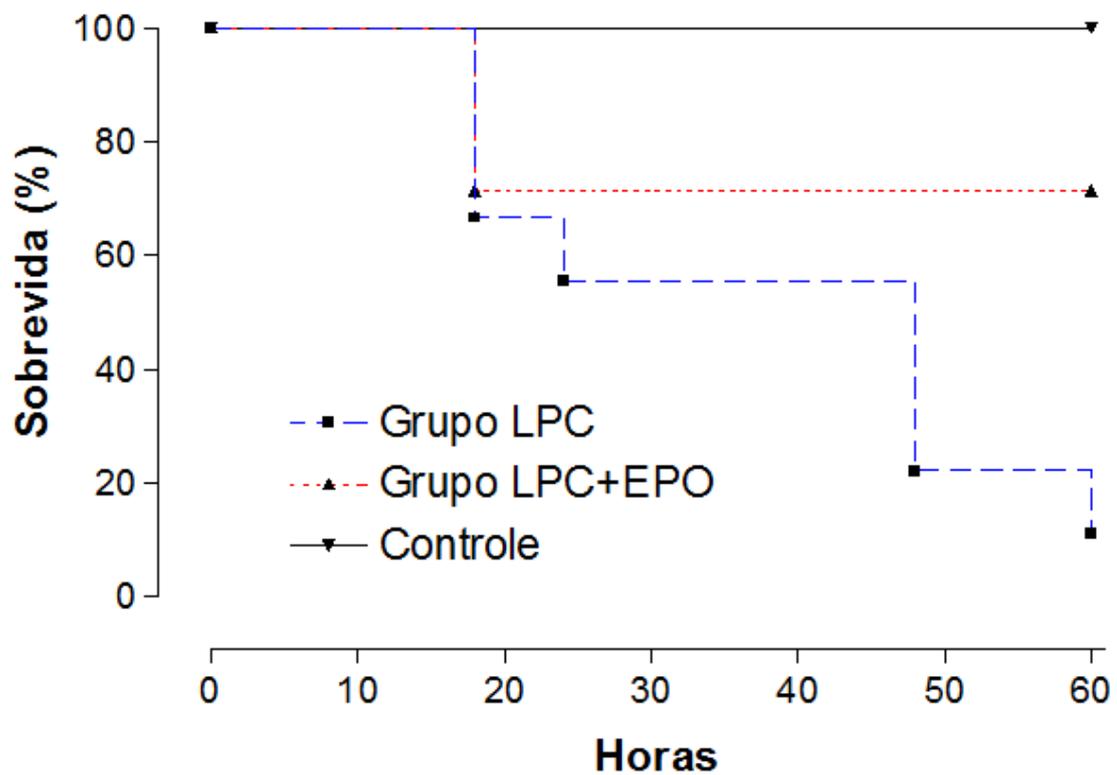


Gráfico 16. Curvas de sobrevida dos grupos Controle, LPC e LPC+EPO.

5. Discussão

Neste estudo avaliamos os efeitos da EPO no modelo animal de sepse induzida após ligadura e punção do ceco, utilizando ratos Wistar machos de 8 semanas de vida. Este modelo de LPC mimetiza as características clínicas da sepse humana após perfuração intestinal e infecção bacteriana de flora mista.³⁴ Utilizamos o modelo com algumas modificações, conforme já descrito na literatura, com antibioticoterapia de largo espectro e expansão volêmica, o que o torna ainda mais clinicamente relevante.^{15, 68} A utilização do antibiótico e da expansão volêmica acontece de forma semelhante ao que ocorre no tratamento dos pacientes sépticos, inclusive mimetizando o tempo usual entre o início da sepse e o diagnóstico da mesma pelo médico (antibiótico e expansão volêmica não foram iniciados antes de seis horas do início da sepse). A reposição volêmica imediatamente após o procedimento cirúrgico foi realizada com a intenção de repor as perdas hídricas que os animais sofreram durante o ato operatório, em que ficavam com a cavidade abdominal aberta.

No nosso estudo, embora os animais não tenham apresentado choque séptico, com PAM média de $74 \pm 7,5$ mmHg no grupo LPC 24 horas após indução da sepse, podemos considerar que utilizamos um modelo de sepse severa, onde os animais sépticos apresentaram níveis de lactato arterial maior que 2 mmol/l 24 horas após a ligadura e punção do ceco.

A dose de EPO utilizada e o momento de sua administração (pré insulto) foram baseadas em estudos anteriores que estudaram os efeitos da

EPO na IRA induzida pela endotoxemia⁶⁶ e na IRA induzida pela isquemia/reperfusão renal.⁷³ A dose utilizada no nosso estudo excede a dose máxima prescrita para pacientes na prática clínica. Porém alguns estudos clínicos têm utilizado doses de EPO mais elevadas que o usualmente prescrito sem, no entanto, apresentar efeitos adversos no grupo tratado. Exemplo seria o estudo que avaliou a eficácia da EPO no AVC isquêmico agudo, onde os pacientes receberam dose diária de EPO de 33.000 UI (cerca de 500 UI/ Kg), por três dias consecutivos após o AVC. A EPO foi capaz de reduzir a área de isquemia cerebral avaliada por exames de RNM e a droga foi bem tolerada nesta dose, sem relatos de eventos adversos.⁷⁴

Com este estudo demonstramos que o pré-tratamento com EPO aumenta a sobrevivência e protege a função renal neste modelo de sepse. A proteção da função renal pela EPO foi bem evidente 24 horas após a cirurgia e a EPO foi capaz de manter sua proteção sobre a função renal 48 horas após a indução da sepse. O grupo de animais sépticos tratados com EPO (grupo LPC+EPO) apresentou melhora da pressão arterial média 24 horas após início da sepse, quando comparados com o grupo LPC, e a EPO foi capaz de manter esta melhora hemodinâmica mesmo após 48 horas da indução da sepse. A EPO também melhorou a anemia relacionada à sepse e o estado metabólico 24 horas após indução da sepse. A ativação do NF- κ B foi bem evidente no grupo LPC e, com 48 horas após início da sepse, os animais tratados com EPO apresentaram inibição da ativação do NF- κ B no tecido renal, além de apresentarem proteção sobre o aumento da área

intersticial relativa e infiltração por macrófagos. Além disso, o grupo LPC+EPO apresentou expressão da enzima eNOS no tecido renal semelhante ao grupo controle, enquanto que o grupo LPC, 48 horas após início da sepse, apresentou queda significativa da expressão desta enzima.

Quanto à função renal, verificamos que os animais sépticos apresentaram disfunção renal, com queda importante do *clearance* de creatinina 48 horas após indução da sepse. Esta disfunção renal na sepse foi homogênea entre os animais e confirmada com o *clearance* de inulina realizada 24 horas após indução da sepse. Quarenta e oito horas após indução da sepse, os animais apresentavam-se muito doentes e com distensão abdominal importante. Por estes motivos não realizamos os experimentos de *clearance* de inulina 48 horas após indução da sepse, porque em pequeno estudo piloto, vários animais, quando em decúbito dorsal para o estudo, apresentaram regurgitação com broncoaspiração e parada respiratória.

Inicialmente, os estudos realizados no modelo LPC, com os mesmos protocolos de antibiótico de largo espectro e expansão volêmica que utilizamos, foram realizados em camundongos idosos.^{47, 75} Nestes estudos os camundongos jovens (com cerca de 8 semanas de vida) não apresentavam IRA. Em ratos Sprague-Dawley idosos houve resposta muito heterogênea da função renal neste mesmo modelo.⁶⁸ No nosso trabalho os animais estudados, mesmo jovens, apresentaram IRA relacionada à sepse de forma homogênea. Esta diferença pode ter ocorrido porque utilizamos animais de linhagem diferente (ratos Wistar), ou porque o *clearance* da

creatinina realizado em experimentos com gaiola metabólica seja mais fidedigno que a medida isolada da creatinina como forma de avaliação da função renal. Na verdade, sabe-se que a presença de cromatógenos no plasma de camundongos pode resultar em uma superestimação da creatinina sérica quando esta é dosada pelo método do ácido pícrico e sugere-se que medidas mais acuradas da creatinina sérica em camundongos devam ser realizadas pelo método HPLC (*high-performance liquid chromatography*).^{76,77} Além disso, a redução da produção da creatinina durante a sepse limita seu uso como marcador de injúria renal na sepse.⁷⁸

Dois estudos experimentais anteriores demonstraram que a EPO tem efeito protetor sobre a função renal na sepse. No primeiro estudo foi utilizado o modelo LPS.⁶⁶ Neste estudo os autores descobriram que a EPO, quando administrada 30 minutos antes da infusão do LPS, atenua de forma significativa a disfunção renal avaliada pelo *clearance* de inulina 16 horas após indução na sepse. A disfunção renal observada durante a endotoxemia foi relacionada à diminuição da superóxido dismutase renal que foi revertida com a administração da EPO.⁶⁶ Neste estudo observou-se aumento na infiltração de neutrófilos no tecido renal e ainda aumento nos níveis séricos de TNF – α . Os animais que receberam pré tratamento com EPO apresentou redução dos níveis séricos de TNF – α e redução da infiltração de neutrófilos no tecido renal, porém estas diferenças não foram estatisticamente significativas.⁶⁶

O segundo estudo empregou tanto o modelo LPS quanto o modelo de LPC e a EPO foi administrada em diferentes momentos após a indução da

sepse.⁶⁷ A EPO foi capaz de proteger a disfunção renal avaliada através da medida dos níveis séricos de creatinina dos camundongos estudados. Neste estudo os autores atribuíram os efeitos benéficos da EPO à inibição da apoptose em vários tecidos e à redução da hipóxia tecidual. Também houve redução da expressão da iNOS, diminuição da produção de NO e formação de peroxinitrito na sepse após tratamento com EPO.⁶⁷ A EPO levou ao aumento de sobrevivência na sepse, no modelo LPS, quando administrada até 2 horas após indução da sepse. Neste estudo a função renal não foi estudada no modelo LPC.⁶⁷ Além disso, não houve diferença entre as respostas inflamatórias dos grupos de animais sépticos tratados ou não com EPO (incluindo ativação do NF- κ B, infiltração de neutrófilos nos tecidos e níveis séricos de proteínas inflamatórias).⁶⁷

Quanto à função tubular renal, observamos aumento da FENa entre os animais sépticos (grupo LPC), avaliada 48 horas após indução da sepse; e os animais sépticos tratados com EPO mantiveram FENa aumentada, sem nenhuma diferença estatística entre estes dois grupos. Em um estudo de isquemia/ reperusão renal onde houve déficit de concentração urinária e aumento da FENa após o insulto, com concomitante redução da expressão de aquaporinas e transportadores de sódio no tecido renal, a EPO foi capaz de prevenir a redução da expressão destes transportadores e melhorou a capacidade de concentração urinária e a reabsorção de sódio pelos rins.⁷⁹

Os animais do grupo LPC apresentaram queda do hematócrito 24 horas após indução da sepse, enquanto o grupo LPC+EPO foi protegido da anemia.

A anemia é bastante comum entre doentes críticos internados em unidades de terapia intensiva, principalmente entre aqueles com IRA.⁸⁰ Nesses pacientes a eritropoiese é prejudicada tanto pela diminuição da produção da EPO, quanto pelos efeitos inibitórios diretos de citocinas inflamatórias sobre a medula.⁸⁰ Em um estudo envolvendo 86 pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva, a administração semanal da EPO resultou em uma redução significativa no número de transfusões sanguíneas, e os valores de hemoglobina destes pacientes que receberam EPO foram significativamente maiores que aqueles que receberam placebo.⁸¹ Neste estudo, embora sem diferença estatística significativa, a taxa de mortalidade foi menor entre os pacientes tratados com EPO (12%) do que entre os que receberam o placebo (23%).⁸¹

Quanto aos parâmetros hemodinâmicos, observamos queda na PAM 24 horas após indução da sepse, e houve melhora hemodinâmica entre os animais sépticos tratados com EPO. Dois estudos recentes demonstraram que a administração da EPO atenua a instabilidade hemodinâmica em modelos experimentais de choque, como o choque hemorrágico e o choque induzido pelo zimozan (um agonista do TLR 2).^{82, 83, 84} Estes resultados, juntamente com os nossos, sugerem que a EPO confere proteção contra o choque em diferentes modelos pré clínicos. Acreditamos que este efeito protetor sobre a hemodinâmica seja decorrente, em parte, do efeito protetor vascular da EPO.

A descoberta de que receptores da EPO são expressos nas células endoteliais vasculares sugere que o sistema vascular seja um alvo biológico

da EPO.⁸⁵ Foi demonstrado que a EPO previne a hiporreatividade vascular e a disfunção endotelial decorrentes da endotoxemia induzidas pelo LPS.⁸⁶ Sabe-se que os efeitos protetores vasculares da EPO são criticamente dependentes da atividade da eNOS.⁸⁷ Camundongos *knock-out* para eNOS apresentam maior susceptibilidade à IRA induzida pelo LPS.²² Por outro lado, camundongos transgênicos, que apresentam aumento importante e crônico (desde o nascimento) de eNOS no seu endotélio, demonstram maior resistência à hipotensão secundária à sepse em modelo LPS e apresentam maior sobrevida que os camundongos controles, além de menor infiltrado pulmonar nos pulmões.⁸⁸ A função renal destes camundongos transgênicos durante a sepse não foi avaliada.

É descrita a redução da atividade da eNOS durante a sepse.^{39, 40, 41} No nosso estudo encontramos queda importante na expressão de eNOS no grupo LPC, enquanto o grupo de animais sépticos que receberam EPO (LPC+EPO) apresentou proteção quanto à redução da expressão de eNOS durante a sepse, apresentando expressão de eNOS semelhante ao grupo controle.

O efeito protetor da EPO em outros tecidos através do aumento da expressão e atividade da eNOS já é conhecido. Em camundongos submetidos a isquemia/ reperfusão miocárdica a EPO reduziu a apoptose miocárdica e o tamanho do infarto em animais selvagens e a redução da apoptose foi associada a um aumento significativo da expressão de eNOS nos miócitos. Neste mesmo estudo camundongos *knock-out* para eNOS apresentaram efeitos protetores da EPO bastante reduzidos.⁸⁹ A EPO é

capaz de mobilizar células tronco hematopoiéticas e estas células apresentam efeitos positivos sobre a angiogênese e recuperação vascular. Mas a mobilização destas células é criticamente dependente da ativação de eNOS pela EPO.⁹⁰ Em um modelo de vasoespasma cerebral induzido por hemorragia subaracnóidea a EPO foi capaz de proteger do vasoespasma através do aumento da expressão de eNOS.⁶³

No presente estudo houve aumento significativo dos níveis de lactato arterial entre os animais sépticos (grupo LPC) quando comparados com o grupo controle. O pré-tratamento com EPO no grupo LPC+EPO previniu o aumento o lactato arterial na sepse. A EPO também corrigiu os níveis de bicarbonato e o déficit de bases na sepse.

Em um coorte de 830 pacientes adultos internados no pronto-socorro com sepse grave, o nível sérico de lactato inicial foi associado com a mortalidade, independentemente da presença de disfunção orgânica ou choque. E a presença de dosagens de lactato arterial com valores altos (maior que 4 mmol/l) ou intermediários (entre 2 e 3,9 mmol/l) foram variáveis independentes de mortalidade.⁹¹

A hiperlactatemia, embora esteja frequentemente associada à instabilidade hemodinâmica, pode ocorrer em condições hemodinâmicas estáveis e, nestes casos, considera-se que seja decorrente de hipoperfusão tecidual oculta.⁹² No nosso estudo o lactato arterial no grupo LPC aumentou em cerca de 4 vezes o valor do grupo controle embora a média da PAM do grupo LPC 24 horas após indução da sepse tenha sido maior que 70 mmHg.

Durante a sepse, a relação entre a oferta e o consumo de oxigênio é alterada, o que sugere um defeito de perfusão da microcirculação.⁹³ Alterações na oxigenação e no fluxo sanguíneo microvascular têm sido demonstradas em diversos modelos experimentais de sepse.⁹⁴ As alterações da microperfusão têm sido relacionadas com a falência de múltiplos órgãos e sistemas que ocorre na sepse. Durante a sepse, a microperfusão é comprometida devido a diversos fatores, como alterações na reologia das hemáceas, a presença de neutrófilos ativado sobre o endotélio com ativação das moléculas de adesão e aumento da agregabilidade, a ativação da casacata de coagulação e deposição de fibrina com formação de microtrombos, e a disfunção de mecanismos de autoregulação vascular. Estes processos resultam em disóxia tecidual com oferta microvascular inadequada de oxigênio.⁹⁴

Em um estudo onde foi realizada ligadura e punção do ceco em camundongos (sem expansão volêmica ou antibioticoterapia) a EPO, quando administrada na dose de 400 UI/Kg, via subcutânea, 18 horas após indução da sepse, não apresentou efeitos sobre a PAM ou sobre os níveis séricos de lactato arterial, porém promoveu aumento imediato na perfusão de capilares sanguíneos no músculo esquelético dos animais.⁹³

Acreditamos que a normalização dos níveis de lactato arterial observada no grupo LPC+EPO possa estar relacionada, em parte, com provável proteção vascular relacionada à EPO, através do aumento da expressão da enzima NO sintase endotelial (eNOS).

No presente estudo encontramos, ainda, ações anti-inflamatórias da EPO, como a redução da área intersticial relativa, a redução do número de macrófagos e monócitos no compartimento túbulo-intersticial e a inibição da atividade do NF- κ B.

A atividade do NF- κ B encontra-se bastante aumentada em cada órgão estudado, tanto em animais, em modelos experimentais de sepse, quanto em humanos com sepse e choque séptico.²⁷ O NF- κ B media a transcrição de um enorme número de genes cujos produtos apresentam importantes papéis na fisiopatologia da sepse.²⁷ A dosagem da atividade do NF- κ B em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com sepse severa é capaz de prever mortalidade, e quanto maior a atividade do NF- κ B, maior mortalidade e pior evolução clínica.⁹⁵

A inibição da ativação do NF- κ B, em modelos experimentais de sepse, reduz a expressão de genes pró-inflamatórios, melhora a hipotensão arterial relacionada à sepse, previne a disfunção miocárdica, a coagulação intravascular disseminada, diminui a permeabilidade microvascular, diminui a infiltração de neutrófilos nos tecidos, além de prevenir a falência de múltiplos órgãos e sistemas na sepse e aumentar a sobrevivência.²⁷

De acordo com os nossos achados, diversos autores também têm demonstrado os efeitos benéficos da inibição do NF- κ B sobre a injúria renal e mortalidade na sepse. Em estudo recente, em que foi utilizado modelo de LPC muito semelhante ao nosso, com antibiótico e expansão volêmica, camundongos sépticos tratados com o metil-2-acetoamidoacrilato (M2AA),

um análogo do etil-piruvato, apresentaram inibição da atividade do NF- κ B (avaliado 24 horas após indução da sepse) com concomitante aumento da sobrevivência e melhora da função renal e hepática. Os efeitos benéficos da M2AA foram obtidos quando a droga foi administrada no momento da cirurgia (LPC) ou até 6 horas após indução da sepse.¹⁰

Outro estudo recente, que também utilizou o modelo LPC (no entanto sem antibiótico ou expansão volêmica), também demonstrou o efeito benéfico da inibição do NF- κ B na sepse. Neste estudo, a co-administração de dois inibidores do NF- κ B (pirrolidina ditiocarbamato, PDTC, administrado 2 horas antes da LPC e siRNA contra NF- κ B p50 administrado 48 horas antes da indução da sepse) protegeu os animais contra a IRA relacionada à sepse e contra a hipotensão relacionada à sepse. Os autores demonstraram, também, que ocorre diminuição da expressão das aquaporinas (AQPs) e dos receptores V2 da vasopressina durante a sepse, e que o pré-tratamento com os inibidores do NF- κ B protegeram os animais sépticos da diminuição da expressão destas proteínas.⁹⁶ Em outro estudo, em que foi utilizado modelo de endotoxemia (LPS), a inibição da Rho quinase com seu inibidor HA-1077 levou à proteção da IRA na sepse com redução na infiltração de macrófagos e monócitos e inibição da atividade do NF- κ B no tecido renal.⁹⁷

Os efeitos anti-inflamatórios da EPO já foram descritos em diversos modelos animais.⁵⁰ Por exemplo, em estudo experimental com isquemia/reperfusão miocárdica, a administração da EPO 24 horas antes do insulto, na dose de 5.000 UI/Kg, reduziu o tamanho do infarto miocárdico e a infiltração de neutrófilos, reduziu os níveis de TNF- α e IL - 6, aumentou IL -

10 e inibiu a ativação do NF - κ B no ventrículo esquerdo.⁹⁸ Em modelo animal de dor neuropática, o pré-tratamento com EPO, nas doses de 3.000 UI/Kg ou de 4.000 UI/Kg, administradas 24 horas antes da transecção de L5, resultou em diminuição da expressão cerebral de TNF- α e IL- 6 decorrente da inibição da atividade do NF- κ B no tecido cerebral.⁹⁹

Recentemente, em modelo animal de endotoxemia, foi observado que a administração de EPO, na dose de 3.000 UI/Kg, 30 minutos antes da infusão do LPS, atenua a inflamação pulmonar e a lesão pulmonar aguda induzidas pela endotoxemia, suprime o aumento da produção de TNF- α na sepse, e inibe a ativação do NF- κ B no tecido pulmonar.¹⁰⁰

Este estudo é o primeiro a documentar os efeitos benéficos da EPO sobre a IRA induzida pela sepse através de mecanismos anti-inflamatórios. Futuros estudos são necessários para investigar os mecanismos pelos quais a EPO inibe a ativação do NF- κ B.

No contexto da sepse, além de inibir a ativação do NF- κ B, a EPO aumenta a expressão da eNOS e deve possuir um efeito protetor sobre o endotélio. A EPO previne a piora hemodinâmica na sepse e previne o aumento dos valores de lactato arterial; protege da IRA relacionada à sepse e aumenta a sobrevida.

5. Conclusões

Nossos dados confirmam os estudos já existentes quanto à participação do NF- κ B e atividade inflamatória na IRA induzida pela sepse. Confirmam também a diminuição da expressão da eNOS durante a sepse.

A EPO é capaz de proteger a função renal neste modelo clinicamente relevante de IRA relacionada à sepse. A EPO confere renoproteção 24 horas após indução da sepse e sua ação renoprotetora se mantém por até 48 horas após indução da sepse.

O pré-tratamento com EPO neste modelo aumenta a sobrevida dos animais sépticos com IRA relacionada à sepse.

A inibição do NF- κ B, junto com a diminuição da área intersticial relativa e com a diminuição da expressão de células ED1 positivas no compartimento túbulo-intersticial sugerem uma ação anti-inflamatória da EPO.

A EPO é capaz de aumentar a expressão da eNOS durante a sepse.

Este estudo é o primeiro a demonstrar efeitos protetores da EPO na mortalidade e na IRA induzida pela sepse através de propriedades anti-inflamatórias e aumento da expressão de eNOS.

7. Referências

1. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word “sepsis” [letter]. *Intensive Care Med* 2006;32:2077.
2. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin*. 2009 Jan;25(1):83-101, viii.
3. Vincent JL, Martinez EO, Silva E. Evolving concepts in sepsis definitions. *Crit Care Clin*. 2009 Oct;25(4):665-75, vii.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003 Apr;31(4):1250-6
5. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20(6):864-74.
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7):1303-10.
7. Bellomo R, Wan L, Langenberg C, May C. Septic acute kidney injury: new concepts. *Nephron Exp Nephrol*. 2008;109(4): e95-100.
8. Janssen van Doorn K, Spapen H, Geers C, Dilltoer M, Shabana W. Sepsis-related acute kidney injury: a protective effect of drotrecogin alpha (activated) treatment? *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008 Oct;52(9):1259-64.

9. Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Oudemans-van Straaten HM, Ronco C, Kellum JA. Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007 May;2(3):431-9.
10. Leelahavanichkul A, Yasuda H, Doi K, Hu X, Zhou H, Yuen PS, Star RA. Methyl-2-acetamidoacrylate, an ethyl pyruvate analog, decreases sepsis-induced acute kidney injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Dec;295(6):F1825-35.
11. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E; Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES Study). *Crit Care*. 2004 Aug;8(4):R251-60.
12. Sales Júnior JA, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, Friedman G, Silva OB Dias MD, Koterba E, Dias FS, Piras C, Luiz RR. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Revista Brasileira Terapia Intensiva*. 2001(1):9-17.
13. Teles JM, Silva E, Westphal G, Filho RC, Machado FR. Surviving sepsis campaign in Brazil. *Shock*. 2008 Oct;30 Suppl 1:47-52.
14. Schrier RW, Wang W. Acute Renal Failure and Sepsis. *N Engl J Med*. 2004 Jul 8;351(2):159-69.

15. Doi K, Hu X, Yuen PS, Leelahavanichkul A, Yasuda H, Kim SM, Schnermann J, Jonassen TE, Frøkiaer J, Nielsen S, Star RA. AP214, an analogue of alpha-melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality. *Kidney Int.* 2008 Jun;73(11):1266-74.
16. Gordon AC, Russell JA, Walley KR, Singer J, Ayers D, Storms MM, Holmes CL, Hebert PC, Cooper DJ, Mehta S, Granton JT, Cook DJ, Presneill JJ. The effects of vasopressin on acute kidney injury in septic shock. *Intensive Care Med.* 2010 Jan;36(1):83-91.
17. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P; Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care.* 2004 Aug;8(4):R204-12.
18. Russell JA: Management of Sepsis. *N Engl J Med.* 2006;355(16):1699-713.
19. Kortegen A, Hofmann G, Bauer M. Sepsis: current aspects of pathophysiology and implications for diagnosis and management. *Eur J Trauma.* 2006;32:3-9.
20. Hotchkiss RS, Karl JE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-50.
21. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002;420:885-891.

22. Wang W, Mitra A, Poole B, Falk S, Lucia MS, Tayal S, Schrier R. Endothelial nitric oxide synthase-deficient mice exhibit increased susceptibility to endotoxin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Nov;287(5):F1044-8.
23. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. 2001, *N Engl J Med*. 345: 588-595.
24. Cobb JP. Nitric oxide synthase inhibition as therapy for sepsis: a decade of promise. *Surg Infect (Larchmt)*. 2001, 2: 93–100.
25. Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D, Silverman MS, Takala J, Donaldson J, Arneson C, Grove G, Grossman S, and Grover R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med* 32: 21–30, 2004.
26. Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*. 2001;29(7 Suppl):S99-106.
27. Liu SF, Malik AB. NF-KB activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L622–L645.
28. Wu L., Gokden N, Mayeux PR. Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jun;18(6):1807-15.

29. Langenberg C, Bellomo R, May CN. Renal vascular resistance in sepsis. *Nephron Physiol* 2006;104:1-11.
30. Rajapakse S, Wijewickrama ES. Non-dialytic management of sepsis-induced acute kidney injury. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009 Nov;20(6):975-83.
31. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*. 2007;35:2408-16.
32. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med*. 2004 Feb;32(2):342-9.
33. Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen Free Radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intensive Care Med*. 2000 Apr;26(4):474-6.
34. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. 2009 Oct;119(10):2868-78.
35. Langenberg, C., Bagshaw, S.M., May, C.N., Bellomo, R. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review. *Crit Care*. 2008;12(2):R38
36. Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jun;161(6):1781-5.

37. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J.* 1994 Mar 1;298 (Pt 2):249-58.
38. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:235-76.
39. Chandra A, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber LD, Traber DL. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins. *Clinics (Sao Paulo).* 2006 Feb;61(1):71-6.
40. Piepot HA, Boer C, Groeneveld AB, Van Lambalgen AA, and Sipkema P. Lipopolysaccharide impairs endothelial nitric oxide synthesis in rat renal arteries. *Kidney Int.* 2000, 57: 2502–2510.
41. Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB, Blantz RC. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest.* 1997 Jul 15;100(2):439-48.
42. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir. Bras.* 2002, vol.17, n.6, pp. 417-423.
43. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Oct;4(10):854-65.
44. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980 Aug;29(2):189-201.

45. Villa P, Sartor G, Angelini M, et al. 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;2:549-553.
46. Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Remick DG. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J Immunol.* 1992 May 1;148(9):2724-30.
47. Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA. Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice *Kidney Int.* 2003 Nov;64(5):1620-31.
48. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: Lypopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock.* 2000 Feb;13(2):110-6.
49. Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int.* 1999; 55: 808-20.
50. Fliser D, Bahlmann FH, deGroot K, Haller H. Mechanisms of diseases: erythropoietin – an old hormone with a new mission? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006 Oct;3(10):563-72.
51. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end stage renal disease with recombinant

- human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med.* 1987;316(2):73-8.
52. Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet.* 1986;2(8517):1175-8.
53. Pribbernow SCM, Souza MV, Prompt CA, Picon PD. Anemia e uso de eritropoetina nos pacientes em hemodiálise no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Rev HCPA* 2006;26(3): 5-11.
54. Eschbach JW. Current concepts of anemia management in chronic renal failure: impact of NKF-DOQI. *Semin Nephrol.* 2000;20(4):320-9.
55. Delano BG. Improvements in quality of life following treatment with r-HuEPO in anemic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1989;14(2 Suppl 1):14-18.
56. Jungers P, Choukroun G, Oualim Z, Robino C, Nguyen AT, Man NK. Beneficial influence of recombinant human erythropoietin therapy on the rate of progression of chronic renal failure in predialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(2):307-12.
57. Kuriyama S, Tomonari H, Yoshida H, Hashimoto T, Kawaguchi Y, Sakai O. Reversal of anemia by erythropoietin therapy retards the progression of chronic renal failure, especially in nondiabetic patients. *Nephron.* 1997;77(2):176-85.
58. Bagnis C, Beaufile H, Jacquaud C, Adabra Y, Jouanneau C, Le Nahour G, Jaudon MC, Bourbouze R, Jacobs C, Deray G. Erythropoietin

- enhances recovery after cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 May;16(5):932-8.
59. Sharples EJ, Yaqoob MM. Erythropoietin in experimental acute renal failure. *Nephron Exp Nephrol*. 2006; 104: e83-8.
60. Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, Mengel M, von Wasielewski R, Lindschau C, Kirsch T, de Groot K, Laudeley R, Niemczyk E, Güler F, Menne J, Haller H, Fliser D. Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure. *Circulation*. 2004 Aug 24;110(8):1006-12.
61. Bernhardt WM, Eckardt KU. Physiological basis for the use of erythropoietin in critically ill patients at risk for acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*. 2008 Dec;14(6):621-6.
62. Fox AC, Coopersmith CM. Erythropoietin in sepsis: a new use for a familiar drug? *Crit Care Med*. 2009 Mar;37(3):1138-9.
63. Santhanam AV, Smith LA, Akiyama M, Rosales AG, Bailey KR, Katusic ZS. Role of endothelial NO synthase phosphorylation in cerebrovascular protective effect of recombinant erythropoietin during subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Stroke*. 2005 Dec;36(12):2731-7.
64. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1340-6.

-
65. Toth C, Martinez JA, Liu WQ, Diggle J, Guo GF, Ramji N, Mi R, Hoke A, Zochodne DW. Local erythropoietin signaling enhances regeneration in peripheral axons. *Neuroscience*. 2008 Jun 23;154(2):767-83.
 66. Mitra A, Bansal S, Wang W, Falk S, Zolty E, Schrier RW. Erythropoietin ameliorates renal dysfunction during endotoxaemia. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Aug;22(8):2349-53.
 67. Aoshiba K, Onizawa S, Tsuji T, Nagai A. Therapeutic effects of erythropoietin in murine models of endotoxin shock. *Crit Care Med*. 2009 Mar;37(3):889-98.
 68. Holly MK, Dear JW, Hu X, Schechter AN, Gladwin MT, Hewitt SM, Yuen PS, Star RA. Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney Int*. 2006 Aug;70(3):496-506.
 69. Volpini RA, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation attenuates tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *Nephron Physiol*. 2004;98(4):p97-106.
 70. Ballard DW, Dixon EP, Peffer NJ, Bogerd H, Doerre S, Stein B, Greene WC. The 65-kDa subunit of human NF-kappa B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1875-9.
 71. Chen Lf, Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*. 2001 Aug 31;293(5535):1653-7.

72. Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G: The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: Distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 1985;54:589–599.
73. Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, Thiernemann C. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int.* 2004 Sep;66(3):983-9.
74. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, R  ther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sir  n AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med.* 2002 Aug;8(8):495-505.
75. Dear JW, Kobayashi H, Jo SK, Holly MK, Hu X, Yuen PS, Brechbiel MW, Star RA. Dendrimer-enhanced MRI as a diagnostic and prognostic biomarker of sepsis-induced acute renal failure in aged mice. *Kidney Int.* 2005 Jun;67(6):2159-67.
76. Meyer MH, Meyer RA Jr, Gray RW, Irwin RL. Picric acid methods greatly overestimate serum creatinine in mice: more accurate results with high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1985 Jan;144(1):285-90.
77. Yuen PS, Dunn SR, Miyaji T, Yasuda H, Sharma K, Star RA. A simplified method for HPLC determination of creatinine in mouse serum. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Jun;286(6):F1116-9.

-
78. Doi K, Yuen PS, Eisner C, Hu X, Leelahavanichkul A, Schnermann J, Star RA. Reduced production of creatinine limits its use as marker of kidney injury in sepsis. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Jun;20(6):1217-21.
 79. Gong H, Wang W, Kwon TH, Jonassen T, Li C, Ring T, FrøkiAer J, Nielsen S. EPO and alpha-MSH prevent ischemia/reperfusion-induced down-regulation of AQPs and sodium transporters in rat kidney. *Kidney Int*. 2004 Aug;66(2):683-95.
 80. du Cheyron D, Parienti JJ, Fekih-Hassen M, Daubin C, Charbonneau P. Impact of anemia on outcome in critically ill patients with severe acute renal failure. *Intensive Care Med*. 2005 Nov;31(11):1529-36.
 81. Silver M, Corwin MJ, Bazan A, Gettinger A, Enny C, Corwin HL. Efficacy of recombinant human erythropoietin in critically ill patients admitted to a long-term acute care facility: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Crit Care Med*. 2006 Sep;34(9):2310-6.
 82. Abdelrahman M, Sharples EJ, McDonald MC, Collin M, Patel NS, Yaqoob MM, Thiernemann C. Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia. *Shock*. 2004 Jul;22(1):63-9.
 83. Cuzzocrea S, Di Paola R, Mazzon E, Patel NS, Genovese T, Muià C, Crisafulli C, Caputi AP, Thiernemann C. Erythropoietin reduces the development of nonseptic shock induced by zymosan in mice. *Crit Care Med*. 2006 Apr;34(4):1168-77.
 84. Thiernemann C. Beneficial effects of erythropoietin in preclinical models of shock and organ failure. (Commentary). *Critical Care* 2007, 11:132-3.

-
85. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 26;91(9):3974-8.
 86. di Villa Bianca R, Sorrentino R, Mitidieri E, Marzocco S, Autore G, Thiemermann C, Pinto A, Sorrentino R. Recombinant human erythropoietin prevents lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in the rat. *Shock*. 2009 May;31(5):529-34.
 87. d'Uscio LV, Smith LA, Santhanam AV, Richardson D, Nath KA, Katusic ZS. Essential role of endothelial nitric oxide synthase in vascular effects of erythropoietin. *Hypertension*. 2007 May;49(5):1142-8.
 88. Yamashita T, Kawashima S, Ohashi Y, Ozaki M, Ueyama T, Ishida T, Inoue N, Hirata K, Akita H, Yokoyama M. Resistance to endotoxin shock in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2000 Feb 29;101(8):931-7.
 89. Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, Lu X, Xenocostas A, Feng Q. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*. 2006 Oct 1;72(1):51-9.
 90. Santhanam AV, d'Uscio LV, Peterson TE, Katusic ZS. Activation of endothelial nitric oxide synthase is critical for erythropoietin-induced mobilization of progenitor cells. *Peptides*. 2008 Aug;29(8):1451-5.
 91. Mikkelsen ME, Miltiades AN, Gaieski DF, Goyal M, Fuchs BD, Shah CV, Bellamy SL, Christie JD. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Crit Care Med*. 2009 May;37(5):1670-7.

-
92. Jansen TC, van Bommel J, Mulder PG, Lima AP, van der Hoven B, Rommes JH, Snellen FT, Bakker J. Prognostic value of blood lactate levels: does the clinical diagnosis at admission matter? *J Trauma*. 2009 Feb;66(2):377-85.
 93. Kao R, Xenocostas A, Rui T, Yu P, Huang W, Rose J, Martin CM. Erythropoietin improves skeletal muscle microcirculation and tissue bioenergetics in a mouse sepsis model. *Crit Care*. 2007;11(3):R58.
 94. Matsuda N, Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res*. 2007 Aug;43(4):117-37.
 95. Arnalich F, Garcia-Palomero E, López J, Jiménez M, Madero R, Renart J, Vázquez JJ, Montiel C. Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun*. 2000 Apr;68(4):1942-5.
 96. Höcherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M. Inhibition of NF-kappaB ameliorates sepsis-induced downregulation of aquaporin-2/V2 receptor expression and acute renal failure in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jan;298(1):F196-204.
 97. Meyer-Schwesinger C, Dehde S, von Ruffer C, Gatzemeier S, Klug P, Wenzel UO, Stahl RA, Thaiss F, Meyer TN. Rho kinase inhibition attenuates LPS-induced renal failure in mice in part by attenuation of NF-kappaB p65 signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 May;296(5):F1088-99.
 98. Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia Z, Li W, Xu J. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the

-
- inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci.* 2006 Apr 4;78(19):2255-64.
99. Jia HB, Jin Y, Ji Q, Hu YF, Zhou ZQ, Xu JG, Yang JJ. Effects of recombinant human erythropoietin on neuropathic pain and cerebral expressions of cytokines and nuclear factor-kappa B. *Can J Anaesth.* 2009 Aug;56(8):597-603.
100. Shang Y, Jiang YX, Xu SP, Wu Y, Wu ZY, Yuan SY, Yao SL. Reduction of pulmonary inflammatory response by erythropoietin in a rat model of endotoxaemia. *Chin Med J (Engl).* 2009 Apr 5;122(7):834-8.

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](#)