

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Débora Alves Caldeira dos Santos Amorim

Efeitos Neuroinflamatórios do Uso de Medicamentos Anestésicas e Sedativas na Sepsis

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

RIO DE JANEIRO

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A524 Amorim, Débora Alves Caldeira dos Santos

Efeitos neuroinflamatórios do uso de medicações anestésicas e sedativas na sepse / Débora Alves Caldeira dos Santos Amorim. – Rio de Janeiro, 2014.

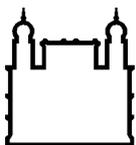
xviii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 55-64

1. Neuroinflamação. 2. Inflamação. 3. Alterações imunes. 4. Alterações neurológicas. 5. Sepse. 6. Medicações anestésicas. 7. Drogas anestésicas. 8. Medicações sedativas. 9. Drogas sedativas. 10. Midazolam. 11. Morfina. 12. Benzodiazepínicos. 13. Opióides. 14. Anestésicos gerais. 15. Isoflurano. 16. Ligadura do Ceco e Perfuração. 17. Modelo animal. I. Título.

CDD 616.944



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: Débora Alves Caldeira dos Santos Amorim

Efeitos Neuroinflamatórios do Uso de Medicamentos Anestésicas e Sedativas na Sepsis

ORIENTADOR: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

Aprovada em: _14_ / _08_ / 2014_

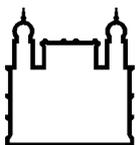
EXAMINADORES:

Prof. Drº. Marcos Adriano da Rocha Lessa

Prof. Drº. Alysson Roncally Silva Carvalho

Profª. Drª. Patrícia Rieken Macedo Rocco

Rio de Janeiro, 14 de agosto de 2014.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, à Nossa Senhora, ao meu Anjo da Guarda e Bons Espíritos que me iluminaram e me deram forças para concluí-lo, me afastando dos abismos e precipícios.

À minha tão querida e “grande família”, sempre porto seguro e exemplo de inspiração. Desde os pequeninhos Matheus e Luiz Arthur e demais que virão, passando pelos meus tão amados marido, pais, padrinho (sempre presente), irmãos, tios, primos, sogros, cunhados até meus avós. Um agradecimento mais do que especial a eles, principalmente pelo amor incondicional, dedicação e paciência, quase sacerdotais, em todos os momentos da minha vida.

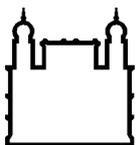
À família que escolhi (meus amigos) pela comunhão de almas, idéias, risadas, brigas, “perebices”, por me compreenderem e esperarem, mesmo quando me enrolo. Por me aceitarem da forma que eu sou.

Aos meus colegas de trabalho, que de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse a estes caminhos, sobretudo Dr^o Eduardo Lami.

Aos meus orientadores, Dr^o Hugo e Dr^o Fernando, pela dedicação, paciência, carinho e respeito que tiveram comigo, mesmo diante das adversidades.

Aos pesquisadores Dr^a Adriana, Dr^o Cassiano, Dr^a Rachel, Dr^a Joana, Dr^a Patrícia e suas equipes maravilhosas, que tanto me ajudaram, sempre incansáveis.

A todos colegas e funcionários do laboratório (não só da Fiocruz, mas também da UFRJ) que foram essenciais durante toda esta trajetória.



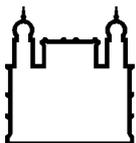
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTO

Agradeço à Deus por ser meu Pastor. À toda minha família por estarem sempre presentes e por me amarem. Aos meus amigos por compreenderem minha ausência. Aos meus orientadores, pela disponibilidade, paciência e por acreditarem em mim. Agradeço especialmente a todos pesquisadores que fizeram parte deste trabalho. Certamente minha tese, com todas dificuldades e mudanças que ocorreram, foi resultado de muitas colaborações (em todos os sentidos desta palavra). Ela só existe como “corpo” pelos braços que me ajudaram e trabalharam, junto comigo, para construí-la. Tenho até medo de me esquecer de agradecer a alguém, pois estaria cometendo uma grande injustiça. Então, peço desde já, que me perdoem caso esqueça algum nome, pois realmente gostaria de citar todos aqui. Por isso, vou agradecer de forma geral, para que todos possam se sentir incluídos, e citar alguns nomes, que não posso deixar. Inicialmente, ao Laboratório de Biofísica da UFRJ, pela colaboração, especialmente Prof. Walter, Alysson, Niedja, Bruno e alunos. À toda equipe do laboratório de Imunofarmacologia, principalmente equipes dos pesquisadores Adriana (Drica), Cassiano, Rachel, Patrícia, Joana, Pedro, Edson, Fabrício. A todos alunos: Silvio, Mariana, Flora, Dani, Dai, Carol, Victor, André, Gabriel, Priscila, Cristina, Alessandra, Emílio, Tathyana, Leandro, Natasha, Luciana, Mariana, Pedro. Gostaria de agradecer também a Mônica, André, Isabel, Isa Cláudia, Rodrigo, Tatiana. Um agradecimento especial à Rose, pela atenção, paciência, presteza e carinho. A todos os funcionários do Pavilhão Osório de Almeida, inclusive aos do Biotério e à Isabelle, que cuidam de nosso principal meio de trabalho com muito respeito. À equipe de pós-graduação da Biologia Celular e Molecular que organiza e formaliza os cursos. Vocês possibilitaram mais do que a minha defesa, a realização de um sonho. Muito obrigada pelos ensinamentos, ajuda, oportunidade e momentos de convívio!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

"Ó mar salgado, quanto do teu sal
São lágrimas de Portugal!
Por te cruzarmos, quantas mães choraram,
Quantos filhos em vão rezaram!
Quantas noivas ficaram por casar
Para que fosses nosso, ó mar!

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu"

(Fernando Pessoa)

LISTA DE ABREVIATÖES

- ALT – Alanina- transferase
- AST – Aspartato- aminotransferase
- BSA – Soro de albumina bovina
- BCA – “B cell-attracting chemokine”, quimiocina atrativa para células B
- C_{3a} – Fator de complemento 3_a
- C_{5a} – Fator de complemento 5_a
- CAM – Concentração alveolar mínima
- CARS – Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória
- CCR2 – Receptor de MCP-1/CCL-2
- Cél. – Células
- CFU – Unidades formadoras de colônia
- CID – Coagulação intravascular disseminada
- CLP – Ligadura do ceco e perfuração, “Cecal ligature and puncture”
- COX 2 – Ciclooxigenase 2

- CTI – Centro de terapia intensiva
- DAPI – 4'6-diamidino-2-fenilindol
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- ELISA – Ensaio imunoenzimático, “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
- EUA – Estados Unidos da América
- GABA_a – Receptor de ácido gama aminobutírico
- Iba-1 – “Anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1”
- ICAM – Molécula de adesão intercelular, “inter cellular adhesion molecule”
- ICD – Código internacional de doenças
- IGF 1 – Fator de crescimento insulina símile 1
- IL – Interleucina
- IL-1ra – Antagonista do receptor de IL-1
- IMC – Índice de massa corpórea
- INR – “International normalized index”, índice internacional normalizado
- IFN – Interferon

- iNOS – Enzima óxido nítrico sintetase induzível

- ikB – Inibidor de NFκB

- IP – Intraperitoneal

- IRAK – Gene codificador do receptor de interleucina 1 associado à quinase 1

- IV – Intravenoso

- KC –Quimiocina derivada de queratinócitos, “keratinocyte-derived chemokine”

- LFA-1 – Linfócitos T associados ao antígeno 1

- LP – Lavado peritoneal

- LPS – Lipopolissacarídeo

- MCP1 ou CCL-2 – Proteína quimiotática de monócitos, “monocyte chemotactic protein -1”

- MDZ – Midazolam

- MIF – Fator inibidor da migração de macrófagos

- MIP – Proteína inflamatória de macrófagos, “macrophage migration inhibitory factor”

- Morf – Morfina

- MyD88 – Gene de resposta primária a diferenciação mielóide

- n° ou N - Número

- NA – Não se aplica

- NFκB – Fator nuclear kappa b

- NK – Células exterminadoras naturais, “Natural killer”

- NMDA – N-metil D-Aspartato

- NO – Óxido nítrico

- NOD – Domínio de oligomerização de nucleotídeo, “Nucleotide-binding oligomerization domain”

- PAMPS – Padrões moleculares associados a patógenos

- PBS – Tampão fosfato salino

- PCR – Proteína C reativa

- PMRP – Padrões moleculares relacionados a patógenos

- PVDF – 3,3',5,5'-tetrametilbenzina

- RIPA – “Radio Immuno Precipitation Assay buffer”

- RNA – Ácido ribonucléico

- ROS – Espécies reativas de oxigênio
- RRP – Receptores de reconhecimento de padrão
- Sal. - Salina
- SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
- SNC – Sistema nervoso central
- SOFA - “Sepsis related organ failure”, insuficiência orgânica relacionada à sepse
- TBS-tween – Solução de tampão tris acrescida de tween
- TGF β – “Transforming Growth Factor β ”
- TLR – Receptores semelhantes ao Toll
- TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzina
- TNF – Fator de necrose tumoral
- TSA – Ágar triptonato soja
- UTI – Unidade de terapia intensiva
- VO – Via oral
- vs – *Versus*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

4. INTRODUÇÃO

Tabela 4.1 - Critérios de sepse.....	2
Tabela 4.2 - Farmacologia dos Opióides: Fentanil, Hidromorfina, Morfina, Metadona e Remifentanil.....	10
Tabela 4.3 - Farmacologia das medicações sedativas.....	12
Figura 4.1 - Ativação neural e humoral do cérebro pela periferia.....	15

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 6.1 - Etapas do CLP.....	23
Tabela 6.1 - Escore de sedação.....	25
Tabela 6.2 - Escore clínico de sepse.....	25
Figura 6.2 - Organograma do projeto.....	28

7. RESULTADOS

Figura 7.1 - Reflexo postural após administração de midazolam ou morfina IP em animais submetidos ao CLP de 2 furos.....	29
Figura 7.2 - Análise da sobrevivência nos grupos CLP (2 furos) tratados com midazolam e morfina IP.....	30
Figura 7.3 - Desenvolvimento de sepse moderada 24 h após a realização do modelo CLP com 2 furos.....	31

Figura 7.4 - Análise do escore clínico de sepse 48 h após o procedimento de CLP de 2 furos.....	32
Figura 7.5 - Análise da contagem de mononucleares no sangue de animais submetidos ao CLP de 2 furos.....	33
Figura 7.6 - Análise da contagem de polimorfonucleares no lavado peritoneal dos animais submetidos ao CLP de 2 furos.....	33
Figura 7.7 - Aumento de CFU peritoneal nos grupos CLP.....	34
Figura 7.8 - Análise da creatinina sérica 24 h após CLP de 2 furos.....	35
Figura 7.9 - Diminuição da Albumina sérica nos grupos CLP.....	35
Figura 7.10 - Análise da enzima hepática AST sérica 24h após CLP de 2 furos.....	36
Figura 7.11 - Análise da ALT 24 h após CLP de 2 furos.....	36
Figura 7.12 - Aumento da citocina MCP-1 ou CCL2 no LP dos grupos CLP.....	37
Figura 7.13 - Aumento da citocina inflamatória IL-1 β no LP dos grupos CLP.....	37
Figura 7.14 - Análise da citocina IL-6 no LP dos camundongos submetidos ao CLP de 2 furos.....	38
Figura 7.15 - Análise da citocina IL-1 β no sangue dos animais submetidos ao CLP de 2 furos.....	38
Figura 7.16 - Análise da citocina MCP-1 no sangue dos animais submetidos ao CLP de 2 furos.....	39
Figura 7.17 - Análise da citocina IL-10 no sangue central dos animais submetidos ao CLP de 2 furos.....	39
Figura 7.18 - Redução da citocina IL-6 cerebral nos animais CLP tratados com midazolam e morfina.....	40
Figura 7.19 - Análise da citocina MCP-1 no córtex dos animais submetidos ao CLP de 2 furos.....	40

Figura 7.20 - Análise da expressão da proteína PSD95 por Western Blotting.....	41
Figura 7.21 - Tendência de aumento dos níveis de PSD95 no hipocampo dos grupos CLP tratados.....	41
Figura 7.22 - Aumento da marcação da micróglia no grupo CLP.....	42
Figura 7.23 - Análise da ativação da micróglia por imunohistoquímica nos grupos SHAM+Salina e CLP+Salina (2 furos).....	43
Figura 7.24 - Foto representativa da ativação da micróglia no grupo CLP, por microscopia confocal.....	43
Figura 7.25 - Aumento da sobrevivência nos grupos CLP (4 furos) tratados com midazolam ou morfina.....	44
Figura 7.26 - Alterações dos escores clínicos de sepse de 24h nos animais tratados com drogas sedativas pós CLP 4 furos.....	45
Figura 7.27 - Análise do escore clínico de sepse 48h após CLP 4 furos.....	46

SUMÁRIO

1. PRELIMINARES

Folha de rosto	i
Ficha catalográfica.....	ii
Folha de aprovação	iii
Folha de dedicatória	iv
Folha de agradecimentos	v
Folha de epígrafe	vi
Lista de abreviações	vii
Lista de ilustrações	xii
2.RESUMO	xvii
3.ABSTRACT	xviii
4. INTRODUÇÃO	1
4.1- Definição de Sepsis.....	1
4.2- Epidemiologia da Sepsis.....	3
4.3- Fisiopatologia da Sepsis.....	5
4.4- Modelos Experimentais de Sepsis.....	7
4.5- Uso de Medicamentos Anestésicos e Sedativos em Modelos Animais.....	8
4.6- Uso de Medicamentos Sedativos e Analgésicos em Pacientes Sépticos.....	9
4.7 - Conexões entre o Sistema Imune e o Sistema Nervoso Central.....	14
4.8 - Impacto de Drogas Anestésicas e Sedativas sobre o Sistema Imune.....	16
4.8.a - Anestésicos Inalatórios.....	16
4.8.b - Benzodiazepínicos.....	17

4.8.c - Propofol.....	18
4.8.d - Opióides.....	19
4.8.e - Dexmedetomidina.....	20
5. OBJETIVOS	22
5.1 OBJETIVO GERAL	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6. MATERIAIS E MÉTODOS	23
6.1- Animais	23
6.2- Ligadura e perfuração do ceco (CLP)	23
6.3- Tratamento com Midazolam ou Morfina.....	24
6.4- Avaliação da Morbimortalidade	24
6.5- Análises de 24horas.....	26
6.6 - Organograma.....	28
6.7- Análises Estatísticas	28
7. RESULTADOS	29
7.1- Avaliação do Grau de Sedação (CLP 2 furos).....	29
7.2- Morbimortalidade do modelo de Ligadura do Ceco e Perfuração (2 furos)	30
7.3- Análises Inflamatórias de 24h (CLP 2 furos).....	32
7.4- Análises Clínicas do Grupo CLP de 4 furos.....	44
8. DISCUSSÃO	47
9. CONCLUSÃO	54
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Efeitos Neuroinflamatórios do Uso de Medicamentos Anestésicos e Sedativos na Sepsis

2. RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Débora Alves Caldeira dos Santos Amorim

A sepsis constitui importante problema de saúde pública. A incidência de sepsis grave vem aumentando nas unidades de Terapia Intensiva, estando associada à alta morbimortalidade. Muitos pacientes evoluem para prótese ventilatória, precisando de drogas sedativas e analgésicas (como o midazolam e a morfina). Os sobreviventes podem apresentar disfunções cognitivas e comportamentais tardias. Estes déficits podem se dar tanto pelas alterações inflamatórias encontradas na sepsis, como também por efeitos imunológicos e neurológicos de medicamentos utilizados. Tentamos mimetizar este cenário clínico, usando o modelo experimental de Ligadura do Ceco e Perfuração (CLP de 2 furos e 4 furos) em camundongos suíços anestesiados com isoflurano inalatório. Após 5 h da cirurgia, eles receberam tratamento com salina 0,5 ml, midazolam 40 mg/kg ou morfina 80 mg/kg IP. Avaliamos escores de sedação, sinais clínicos de sepsis, sobrevivência (7-15 dias) e parâmetros neuro-inflamatórios 24 h após o CLP. Encontramos melhora dos índices de sobrevivência nos grupos tratados com morfina, sobretudo no modelo de CLP de 4 furos ($p < 0,05$). Observamos melhora dos escores clínicos de 24 h nos animais tratados com morfina e submetidos ao CLP de 4 furos ($p < 0,05$). Houve tendência de diminuição das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e de MCP-1 no lavado peritoneal, medidas por ELISA, nos grupos CLP 2 furos tratados com midazolam e morfina. Esta redução também foi verificada no córtex cerebral retirado pós perfusão. A redução de IL-6 foi significativa nos 2 grupos CLP tratados e de MCP-1, no grupo CLP tratado com midazolam ($p < 0,05$). Esses resultados foram acompanhados pelo aumento da proteína pós-sináptica PSD95, no hipocampo dos animais dos grupos CLP tratados. Tais efeitos poderiam indicar um benefício antiinflamatório no uso de midazolam e da morfina, nas fases iniciais de sepsis. Apesar dos indícios de melhorias neuroinflamatórias, ainda são necessários mais estudos para relacionarmos estas alterações a possíveis repercussões clínicas.

3. ABSTRACT

Sepsis is a main problem in Public Health. The incidence of severe sepsis is rising and is associated with high morbimortality indices. Many patients will need any kind of ventilatory assistance, sedative and analgesic drugs (e.g. midazolam and morphine). Survivals may present late cognitive and neurocomportamental dysfunctions. Sepsis inflammatory alterations, as well as neurologic and immunomodulatory effects mediated by these drugs may cause the deficits. We tried to simulate this clinical setting using the animal model of Cecal Ligature and Puncture (CLP), with 2 and 4 perforations. Swiss mice were submitted to inalatory anesthesia with isoflurane for the surgery. After 5 h, they received saline 0,5 ml, midazolam 40 mg/kg or morphine 80 mg/kg IP. We quantified sedation score, sepsis score, survival (7-15 days) and inflammatory parameters in 24 h after CLP. We found better survival taxes in the CLP group treated with morphine, especially in CLP with 4 perforations ($p < 0,05$). There were also better sepsis clinical scores 24 h and 48 h after CLP with 4 perforations, treated with morphine ($p < 0,05$). The inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and MCP-1 were lower in peritoneal lavage of CLP with 2 perforations treated with morphine and midazolam, measured by ELISA. This reduction was also found in cerebral cortex, dissected after perfusion. IL-6 reduction in cortex was important in both treated groups (CLP+Morphine and CLP+Midazolam) and MCP-1 reduction in CLP+Midazolam group ($p < 0,05$). Postsynaptic protein PSD95 was augmented in hippocampal of CLP treated group. The results may point to anti-inflammatory benefits in using midazolam and morphine in initial phases of sepsis. Nevertheless, more studies are necessary to relate the potential neuroinflammatory benefits of these drugs with clinical repercussions.

4.0) Introdução

4.1) Definição de Sepses

A sepsis é uma resposta sistêmica deletéria do hospedeiro a uma infecção, levando a um quadro clínico descrito como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS).

Sua definição sofreu algumas modificações ao longo do tempo. Em 1991, o colégio americano “American College of Chest Physicians” e a sociedade “Society of Critical Care Medicine” realizaram uma conferência, onde propuseram definições para Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica, sepsis, sepsis severa e choque séptico. O diagnóstico de SIRS baseava-se na presença de pelo menos 2 dos 4 critérios relacionados: alteração de temperatura corporal ($> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$), taquicardia (frequência cardíaca > 90 batimentos/minuto), hiperventilação (frequência respiratória > 20 incursões/minuto ou pressão parcial de CO_2 no sangue arterial $< 32\text{mmHg}$), contagem de leucócitos no sangue alterada (> 12.000 céls/ μl ou < 4.000 céls/ μl). Sepsis foi definida como SIRS associada à infecção presumida ou comprovada. Sepsis grave, como sepsis acompanhada de disfunção orgânica. Choque séptico, por sua vez, definido por sepsis com hipotensão, refratária à reposição volêmica (Bone e cols., 1992).

No entanto, tal definição de sepsis apresentava algumas limitações. Os critérios de SIRS e sepsis não eram específicos, confundiam-se. Além disso, não eram consideradas outras alterações laboratoriais presentes na sepsis, como os marcadores bioquímicos proteína C reativa (PCR), pró-calcitonina, Interleucina-6 (IL-6), por vezes elevados na sepsis.

Por isso, em 2001, foi realizado outro consenso/conferência pelas sociedades “Society of Critical Care Medicine”, “European Society of Intensive Care Medicine”, “American College of Chest Physicians”, “American Thoracic Society” e “Surgical Infection Society”, que acabou por modificar a definição de sepsis. O novo critério diagnóstico passou a basear-se em parâmetros clínicos e laboratoriais. Incluía a presença de infecção e pelo menos um dos critérios listados na tabela 4.1 abaixo (Mayr e cols., 2014).

Termo	Critério
<i>Sepse</i>	Infecção suposta ou documentada com algum dos critérios clínicos ou laboratoriais abaixo
<i>Parâmetros gerais</i>	Febre, hipotermia, taquicardia, taquipnéia, alteração do estado mental, hipotensão, diminuição do débito urinário, edema periférico significativo, balanço hídrico positivo
<i>Parâmetros inflamatórios</i>	Leucocitose, leucopenia, hiperglicemia, aumento da proteína C-reativa (PCR), procalcitonina, creatinina, anormalidades da coagulação, aumento do débito cardíaco, redução da saturação venosa mista de oxigênio
<i>Parâmetros hemodinâmicos</i>	Hipotensão, elevação da saturação venosa mista de oxigênio, aumento do débito cardíaco
<i>Disfunção Orgânica</i>	Hipoxemia arterial, oligúria aguda, aumento da creatinina, do INR (“International normalized index”), ou tempo de tromboplastina parcial ativada, trombocitopenia, íleo, hiperbilirrubinemia
<i>Parâmetros de perfusão tissular</i>	Hiperlactatemia, diminuição da perfusão capilar

Tabela 4.1 – Critérios de sepse (Mayr e cols., 2014).

Não houve mudança no conceito de sepse grave, definida como sepse associada à disfunção orgânica. Apesar de haver vários critérios para definir disfunção de órgãos, foi recomendado o uso do score da Disfunção de órgãos associada à sepse (SOFA – “Sepsis-related organ failure”) (Vincent e cols, 1996). Também foi proposta uma definição mais explícita para choque séptico: hipotensão persistente, com pressão arterial sistólica < 90 mmHg ou pressão arterial média < 70 mmHg, mesmo após adequada ressuscitação com fluidos.

Alguns estudos epidemiológicos de cunho administrativo usam definições de sepse baseadas no código internacional de doenças (ICD-9CM), o que pode subdiagnosticar a patologia. O diagnóstico associado de sepse com o sítio de infecção e disfunção orgânica, parece ser mais fidedigno (Mayr e cols., 2014).

A sepse grave é a principal causa de morte nos Estados Unidos (EUA) e a principal causa de morte entre pacientes críticos, em unidades intensivas não coronarianas. O sítio de infecção relacionado a maiores taxas de mortalidade parece ser o pulmonar (pneumonia). Houve aumento da incidência de sepse por microorganismos gram-positivos em comparação a gram-negativos (Mayr e cols., 2014).

Estudos recentes sugerem que doenças agudas piorem doenças crônicas pré-existentes ou resultem em novas doenças crônicas, levando a piores desfechos clínicos nos sobreviventes. Verifica-se maior suscetibilidade em pacientes idosos, do sexo masculino, negros, com doenças crônicas (Mayr e cols., 2014).

4.2) Epidemiologia da Seps

A seps grave e o choque séptico constituem sérios problemas de saúde pública, afetam milhões de pessoas por ano no mundo, são responsáveis pela morte de 1 em cada 4 pessoas atingidas (Schorr e Dellinger, 2014).

Estima-se que a incidência aumente com a idade, bem como com o aumento da prevalência do vírus da imunodeficiência adquirida. Nos Estados Unidos, os gastos públicos chegam a atingir U\$16,7 bilhões (Schorr e Dellinger, 2014).

As taxas de incidência de seps grave dependem, na verdade, do momento em que se faz o diagnóstico da disfunção orgânica e se a disfunção é atribuída a uma infecção subjacente.

Nos EUA, a seps grave é responsável por 2% das admissões hospitalares, sendo metade destes pacientes tratados em unidades de terapia intensiva (o que corresponde a 10% das internações nestes setores). O número de casos por ano, nos EUA, excede os 750.000 e parece estar em ascensão. Em outros países desenvolvidos, a incidência de seps em unidades intensivas é bastante similar (Schorr e Dellinger, 2014).

Dentre os estudos epidemiológicos retrospectivos, destaca-se o de Angus e colaboradores. Eles analisaram, em 1995, nos EUA, 6.621.559 internações hospitalares e identificaram 192.980 casos de seps grave. Eles estimaram 751.000 casos/ano, sendo que cerca de 51,1% receberam cuidados intensivos. A mortalidade hospitalar foi de 28,6% e a mortalidade na terapia intensiva de 34,1% (Angus e cols., 2001). Outro estudo retrospectivo importante (Martin e cols., 2003) analisou 750 milhões de internações hospitalares nos EUA, entre 1979 e 2000, identificando 10.319.418 casos de seps, com importante incremento da incidência de seps.

Um dos primeiros grandes estudos prospectivos observacionais realizados foi o de Rangel-Frausto e cols., em 1995. Ele acompanhou cerca de 3708 pacientes admitidos em hospital universitário durante 9 meses, selecionando aqueles que preenchiam critérios de SIRS (os quais foram seguidos por 28 dias). Destes, 17% desenvolveram seps, 13% seps grave e 13% choque séptico. A mortalidade aumentou progressivamente de SIRS, seps, seps grave a choque séptico: 7%, 16%, 20% e 46%, respectivamente. Os estágios de SIRS, seps e choque séptico representam um contínuo hierárquico de intensidade da resposta inflamatória sistêmica (Japiassú, 2009).

Estudos em países em desenvolvimento mostraram alto grau de disfunção orgânica e alta mortalidade de pacientes com seps grave. Ainda são poucos os dados referentes à epidemiologia da seps no Brasil. Destacam-se os estudos PROGRESS (“Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis”), BASES Study (“Brazilian Sepsis Epidemiological

Study”), SEPSE Brasil e o COSTS (“A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in brazilian intensive care units”).

O BASES (Silva e cols., 2004), estudo multicêntrico em unidades públicas e privadas, em São Paulo e Santa Catarina, identificou densidade de incidência de sepse de 57,9 por 1000 pacientes-dia. A taxa de letalidade de pacientes com SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica), independente da causa, foi de 24,2%; de pacientes com sepse foi de 33,9%; sepse grave de 46,9% e choque séptico 52,2%.

O SEPSE Brasil (Sales Júnior JAL e cols., 2006) e o COSTS (Sogayar e cols., 2008) apontam taxas de letalidade similares. O SEPSE Brasil, realizado em unidades intensivas de todas as regiões brasileiras (Sales Júnior e cols., 2006) apresentou incidência de sepse de 16,7%. Ocorreu sepse em 19,6% dos pacientes, sepse grave em 29,6% e choque séptico em 50,8%. Houve diferenças regionais. Pacientes da região Sudeste eram mais idosos e tiveram menor mortalidade que outros das regiões Sul, Nordeste, Centro-Oeste e Norte. A mortalidade global foi de 46,6%, aumentando gradativamente de 16,7% para pacientes com sepse até 65,3% para choque séptico.

O estudo multicêntrico PROGRESS (Beale e cols., 2009), por sua vez, revelou taxas de letalidade alarmantes. Os pacientes brasileiros ficaram internados no hospital por mais tempo (média de 33 dias contra 28 dias do global) e apresentaram maior taxa de mortalidade hospitalar (67,4% no Brasil *versus* 49% de média geral).

A morbidade da sepse é igualmente substancial. Ela responde por 2 a 11% das internações hospitalares ou em unidades de terapia intensiva americanas. Alguns sobreviventes parecem ter complicações tardias, tais como disfunções respiratórias, renais, hepáticas ou neurológicas (Guirgis e cols., 2014).

A disfunção cerebral aguda, por si só, é uma causa independente de morbimortalidade no paciente séptico. Ela parece ser um fator determinante para o desenvolvimento de distúrbios cognitivos nos sobreviventes. Estudos clínicos demonstraram que cerca de 60% dos sobreviventes de sepse podem apresentar déficits cognitivos permanentes e perda de memória. A encefalopatia associada à sepse e suas consequências a longo prazo na função cognitiva ainda são pouco compreendidas. O uso de modelos pré-clínicos vem facilitando a elucidação dos principais mecanismos, como disfunção vascular e mitocondrial, distúrbios de neurotransmissão, inflamação e morte celular (Hernandes e cols., 2014).

Tendo como estímulo a importância deste tema, muitos esforços têm sido empregados para o desenvolvimento de terapias potenciais, para a melhor compreensão da inflamação sistêmica, da falência de múltiplos órgãos, para o desenvolvimento de biomarcadores de resposta terapêutica e prognóstica.

4.3) Fisiopatologia da Sepses

A sepses é uma síndrome caracterizada por um conjunto de manifestações graves que tem como causa uma infecção. O seu desenvolvimento depende das relações estabelecidas entre o microorganismo causador da infecção e seu hospedeiro. A inflamação sistêmica associada à sepses envolve a ativação dos sistemas imune e neuro-endócrino. A sepses desencadeia tanto uma produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios (incluindo citocinas, radicais de oxigênio e mediadores lipídicos), quanto de hormônios relacionados ao estresse oriundos do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (Vanhorebeek e van den Berghe, 2006).

A interação entre microorganismo e hospedeiro se inicia pelo reconhecimento de substâncias do agente etiológico, como os chamados padrões moleculares relacionados aos patógenos (PMRP) identificados pelos receptores de reconhecimento de padrão (RRP) expressos pelas células do sistema imune inato (Flohé e cols., 2006). Um exemplo é o reconhecimento das endotoxinas de bactérias gram-negativas, formadas principalmente por lipopolissacarídeos (LPS), por receptores CD14 e TLR4 (representante da família “Toll like”) existentes na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Medzhitov, 2001).

Outras moléculas da família “Toll like” também estão implicadas neste primeiro contato com o sistema imune. TLR3 parece estar relacionado à identificação de RNA (ácido ribonucléico) de dupla hélice; TLR5 na identificação de flagelina; TLR9 a seqüências do DNA (ácido desoxirribonucléico) bacteriano; TLR2 relacionada a infecções por bactérias gram-positivas (Flohé e cols., 2006).

Após esta fase de reconhecimento, sucedem-se os eventos de ativação celular e produção de citocinas, culminando com a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS).

Mediante a ligação de PMRP aos receptores “Toll like”, são acionadas diferentes vias celulares de sinalização, que incluem a participação de proteínas intracelulares NOD (“Nucleotid-binding oligomerization domain”) e MyD88 (“Myeloid differentiation protein 88”). A interação de MyD88 com a enzima IRAK (quinase associada ao receptor de interleucina-1) leva à desinibição do fator de transcrição nuclear NF- κ B (fator nuclear kappa b), responsável pela ativação de genes para transcrição de inúmeras citocinas participantes da SIRS, independentemente de haver ou não infecção. Essa interação leva a formação de quinases capazes de desconectar a proteína I κ B (inibidor de NF κ B) ligada ao fator de transcrição nuclear NF κ B (Cohen, 2002).

Tal seqüência, que culmina com a liberação de NF- κ B, determina a produção e secreção de inúmeras citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL) 1, 2, 6, 8 e 12; TNF (Fator de

Necrose Tumoral) α e β . Alguns pacientes evoluem precocemente para óbito, em decorrência da intensa reação inflamatória sistêmica. Em contrapartida, citocinas anti-inflamatórias também são produzidas, como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-11 e IL-13, sobretudo pelos sobreviventes. Isso possibilita o desenvolvimento de anergia e alentecimento das respostas aos agentes etiológicos, contexto chamado de síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS) (Hotchkiss e Karl, 2003).

IL-1 e TNF α induzem a síntese de citocinas, como IL-6 e IL-8 (Lobo e Lobo, 2007). O TNF α parece ter um efeito protetor durante a fase de imunossupressão associada à sepse (Echtenacher e cols., 2003). Já IL-6 está associado à gravidade da sepse, quando seus níveis estão aumentados em cerca de 60-100% (Gogos e cols., 2000).

Outra citocina inflamatória importante na sepse é o Fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), que regula a expressão de TLR-4 e a produção de TNF por macrófagos estimulados por LPS (Roger e cols., 2001). São quimiocinas inflamatórias produzidas na sepse IL-8/KC (recruta neutrófilos), MCP-1/CCL2 e MIP1 α (atraem monócitos, linfócitos, basófilos, eosinófilos e células “Natural Killer”- NK) (Vermont e cols., 2006). Em animais sépticos, MCP-1/CCL2 está relacionado com a diminuição dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como KC e IL-6 (24h após o procedimento de Ligadura do ceco e perfuração - CLP) e de MIF (6-24h após o CLP). Por outro lado, verifica-se aumento dos níveis de IL-10 (24h pós CLP) (Gomes e cols., 2006b; Cunha MGAT, 2010).

É complexa a regulação deste equilíbrio pró e antiinflamatório, onde se destaca a atuação de monócitos e macrófagos, como ativadores da resposta imune adaptativa. Macrófagos residentes nos tecidos reconhecem microorganismos patógenos e secretam quimiocinas capazes de recrutar fagócitos para o local da infecção. Neutrófilos são uma das primeiras células inicialmente atraídas. Assim, durante as fases iniciais da sepse, observa-se um aumento da migração de neutrófilos e outros polimorfonucleares para o local infeccioso (Fialkow e cols., 2006). Ao fagocitarem células necróticas ou bactérias, os macrófagos induzem os linfócitos a assumirem um fenótipo Th1, o que leva à liberação de substâncias pró-inflamatórias como interferon alfa (IFN- α), interferon delta (IFN- δ) e IL-2. Se fagocitarem células apoptóticas, ativam o fenótipo fagocitário Th2, que leva à produção de IL-4 e IL-10 (Hotchkiss e cols., 2001).

A interação entre macrófagos, linfócitos T ativados e B levou a novos níveis de regulação. O papel Th1 na imunidade celular em infecções intracelulares e da interleucina 4 (Th2), na infecção extracelular, fez surgir um conceito análogo: o dos macrófagos M1 e M2.

Os macrófagos estão associados a uma variedade de receptores para fator de crescimento, citocinas produzidas por linfócitos T helper, células B e produtos de microorganismos. Eles podem adquirir 2 fenótipos: clássico M1 ou alternativo M2. Os macrófagos ativados M1 são induzidos por $\text{INF}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$. São potentes indutores e potencializadores da resposta Th1. Já as citocinas de caráter imunossupressor, como IL-4, IL-10, IL-13, induzem uma forma alternativa de macrófagos, M2, que polarizam o repertório Th2 (Martinez e Gordon, 2014).

O $\text{TNF}\alpha$ também tem um papel relevante na sepse por estimular leucócitos e células endoteliais a liberarem outras citocinas, expressar moléculas de adesão na superfície celular e aumentar o “turnover” do ácido aracdônico. Além disso, a interação $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 propicia o desenvolvimento de um estado pró-coagulante, inibindo a trombomodulina, e provocando uma série de alterações hemodinâmicas (aumento da permeabilidade vascular, diminuição da resistência vascular periférica, inotropismo negativo, etc) (Curi e Homem de Bittencourt Júnior, 2007).

Distúrbios vasculares podem ocorrer pela ativação da cascata do complemento, via endotoxinas, liberando C_{3a} e C_{5a} , os quais induzem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária, ativação de neutrófilos. As endotoxinas também são capazes de promover liberação de calicreína, cininogênio, bradicinina (pela ativação do fator XII de Hageman). A ativação do fator XII pode acionar a via intrínseca da coagulação, resultando em coagulação intravascular disseminada (CID) (López-Aguirre e Páramo, 1999).

4.4) Modelos Experimentais de Sepse

Foram propostos vários modelos experimentais animais de sepse. Os modelos variam em termos de complexidade e capacidade de translação para a prática clínica. São exemplos a administração exógena (intravenosa, intraperitoneal, intratraqueal) de toxinas ou bactérias vivas; modelos de sepse abdominal (Dyson e Singer, 2009).

Os modelos de toxemia são mais fáceis de serem reproduzidos e apresentam maior homogeneidade dentre os modelos *in vivo*. No entanto, eles não são capazes de reproduzir a complexidade da sepse humana (Buras e cols., 2005). A injeção de endotoxinas em animais causa um aumento transitório de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{TNF}\alpha$, IL-1 e IL-6. Em contrapartida, em humanos, a resposta do hospedeiro desencadeada por bactérias vivas leva a um aumento de citocinas sustentado por período mais prolongado e de menor magnitude

(Remick e Ward, 2005). O modelo de administração de bactérias vivas, por sua vez, pode falhar na replicação e colonização das bactérias (Buras e cols., 2005).

Os modelos de sepse abdominal são mais promissores, se aproximando mais do cenário clínico. Como desvantagem, porém, são difíceis de serem reproduzidos.

Dentre os modelos de sepse abdominal podemos citar a injeção intraperitoneal de fezes; peritonite causada por stent em cólon ascendente; o procedimento de ligadura do ceco e perfuração (CLP), considerado o padrão ouro para modelos animais de sepse. O número de punções do ceco e o tamanho da agulha produzem variados graus de gravidade (Wichterman e cols., 1980). Esta técnica induz a uma resposta inflamatória, imune, hemodinâmica e bioquímica similar à sepse humana, porém tem a desvantagem de requerer a realização de uma cirurgia. No modelo de CLP, o aumento das citocinas parece ser mais lento e consistente (Dyson e Singer, 2009).

O modelo de CLP foi desenvolvido em 1980 por Wichterman e cols. Consiste na exposição do ceco, seguida de ligadura e perfuração abaixo da válvula íleo-cecal, com extravasamento de fezes para a cavidade abdominal. Seus efeitos são semelhantes aos de uma apendicite supurada. De acordo com o tamanho e o número de perfurações, os animais evoluem para diferentes perfis de morbimortalidade e pode-se classificar o CLP como letal ou sub-letal (conforme descrito por Benjamin e cols., em 2000).

4.5) Uso de Medicamentos Anestésicos e Sedativos em Modelos Animais

Os animais que serão submetidos a modelos cirúrgicos de sepse precisam ser adequadamente anestesiados durante o procedimento. Frequentemente, camundongos são anestesiados via injeções subcutâneas ou intraperitoneais de hipnóticos, analgésicos ou relaxantes musculares. Apesar de prático e custo efetivo, este método tem desvantagens. Uma vez que a dose inicial da droga tenha sido administrada, o curso e a profundidade do plano anestésico não podem ser tão bem controlados. Existe uma considerável variabilidade nas doses requeridas de acordo com a idade, o sexo do animal, o ritmo circadiano, levando a um estreitamento da margem de segurança. Além disso, muitos dos protocolos de injeções anestésicas levam a períodos prolongados de recuperação, associados à hipotermia e comprometimento de funções fisiológicas. Estes problemas podem ser minimizados com a administração de anestesia inalatória, uma vez que o período de recuperação anestésica é mais curto e há possibilidade do ajuste de dose conforme a necessidade individual de cada animal. Em termos de sobrevivência, a anestesia inalatória parece ser mais segura. No entanto, efeitos negativos sobre o sistema cardiovascular e depressão ventilatória são efeitos colaterais

possíveis, relacionados também aos anestésicos voláteis. Isoflurano e sevoflurano são os 2 anestésicos inalatórios mais usados nas anestésias gerais humanas e veterinárias (Cesarovic e cols., 2012).

Opióides e benzodiazepínicos, comumente utilizados em pacientes, são menos usados em modelos experimentais com pequenos animais e têm sido associados a eventos imunossupressivos, capazes de interferir no desfecho clínico (Barr e cols., 2013).

4.6) Uso de Medicações Sedativas e Analgésicas em Pacientes Sépticos

Muitos dos pacientes sépticos evoluem com distúrbios ventilatórios, síndrome do desconforto respiratório agudo, necessitando de internações em centros de terapia intensiva (CTI) e suporte ventilatório.

Os pacientes críticos, em unidades intensivas, são suscetíveis a episódios de dor durante a internação, identificados como fontes de estresse. A dor pode ser relacionada a cirurgias, queimaduras, cânceres, traumas ou associada a determinados procedimentos. As consequências físicas e psicológicas da dor podem se prolongar. Estudos em pacientes ainda hospitalizados, que receberam alta de unidades intensivas, mostraram que cerca de 82% lembravam-se de terem sentido dor ou desconforto associado à intubação orotraqueal, por exemplo. Esses pacientes têm maior incidência de dor crônica, síndrome do estresse pós traumático e menores índices de qualidade de vida (21%) (Barr e cols., 2013). Dessa forma, a dor deve ser continuamente monitorizada. Preconiza-se que ela seja tratada como 5º sinal vital.

Opióides, como o fentanil, a morfina, a metadona, o remifentanil, são considerados medicações de 1ª linha no manejo da dor de pacientes críticos. Eles atuam ativando receptores opióides μ , κ , δ periféricos e centrais. A escolha do opióide e do seu regime de dose depende de vários fatores, dentre eles a farmacocinética e a farmacodinâmica de cada droga. A tabela abaixo (tabela 4.2) compara diferenças farmacológicas de diferentes opióides usados na prática clínica.

Outros tipos de analgésicos, como anestésicos locais, anti-inflamatórios não esteroidais, anticonvulsivantes, podem ser usados como adjuvantes, reduzindo o consumo de opióides. No entanto, a efetividade e a segurança do seu uso isolado em pacientes críticos ainda não foram adequadamente estudadas (Barr e cols., 2013).

Opióides	<i>Dose equianalgésica (mg) IV</i>	<i>Dose equianalgésica (mg) VO</i>	<i>Início de ação</i>	<i>Meia-vida de eliminação</i>	<i>Meia-vida contexto-sensitiva</i>	<i>Metabolismo</i>
Fentanil	0,1	NA	1-2 min	2-4 h	200 min (6 h de infusão)	N-dealquilação
Hidromorfina	1,5	7,5	5-15 min	2-3 h	NA	Glicuronidação
Morfina	10	30	5-10 min	3-4 h	NA	Glicuronidação
Metadona	NA	NA	1-3 d	15-60 h	NA	N-demetilação
Remifentanil	NA	NA	1-3 min	3-10 min	3-4 min	Hidólise por esterase plasmática

Opióides	<i>Metabólitos ativos</i>	<i>Dose intermitente</i>	<i>Taxas de infusão</i>	<i>Outras informações</i>
Fentanil	Não	0,35-0,5 µg/kg/IV cada 0,5-1 h	0,7-10 µg/kg/h	Acúmulo com disfunção hepática
Hidromorfina	Não	0,2-0,6 mg IV cada 2 h	0,5-3 mg/h	Acúmulo com disfunção hepática e renal
Morfina	6 e 3-glicuronídeo	2-4 mg IV cada 2 h	2-30 mg/h	Acúmulo com disfunção hepática e renal
Metadona	Derivado n-demetilado	IV/VO: 10-40 mg cada 6-12 h	Não recomendado	Farmacocinética não previsível
Remifentanil	Não	NA	1,5 µg/kg IV	Não se acumula com disfunção hepática e renal

Tabela 4.2 – Farmacologia dos opióides: Fentanil, Hidromorfina, Morfina, Metadona e Remifentanil. Comparações entre dose equipotente, início de ação, meia-vida de eliminação, meia-vida contexto-sensitiva, vias metabólicas, metabólitos ativos, dose intermitente, taxas de infusão e efeitos colaterais (Barr e cols., 2013). NA: não se aplica

Além da dor, agitação e ansiedade ocorrem frequentemente em pacientes internados em unidades intensivas, sendo necessário, por vezes, o uso de sedativos. Antes da sua administração, porém, devem ser excluídas causas subjacentes, como a própria dor, *delirium*, hipoxemia, hipoglicemia, hipotensão, abstinência.

Os sedativos podem ser titulados com o intuito de produzirem uma sedação leve (paciente responsivo a comandos) à profunda (não responsivo ao estímulo doloroso). Múltiplos estudos demonstraram consequências negativas da sedação profunda e prolongada *versus* benefícios da sedação leve. O uso de escalas de sedação, protocolos para minimizar o consumo de sedativos, o uso de medicações não benzodiazepínicas parece estar associado a melhores desfechos, menor tempo de ventilação mecânica, menores incidências de *delirium* e de disfunção cognitiva tardia (Barr e cols., 2013; Quilez e cols., 2012).

Segundo o “guideline” de 2013 da “Critical Care” sobre manejo de dor, agitação e *delirium* em CTI, sugere-se o uso da escala subjetiva de sedação de Richmond (RASS) e/ou a escala de agitação-sedação (SAS) para avaliação da profundidade de sedação. Prefere-se estratégias de sedação usando-se medicações não benzodiazepínicas (como propofol ou dexmedetomidina), a fim de se atingir melhores desfechos clínicos em pacientes sob ventilação mecânica (nível de evidência +2B). A sedação com benzodiazepínicos está associada a maior tempo de internação em unidades fechadas e tempo de ventilação mecânica, quando comparada à sedação com propofol (Hall e cols., 2001; Fong e cols., 2007) ou dexmedetomidina (Ricker e cols., 2009).

Delirium é uma síndrome caracterizada por início agudo de disfunção cerebral com flutuações do *status* mental, do nível de consciência, falta de atenção e pensamento desordenado. É um preditor negativo independente de desfechos clínicos em pacientes internados em unidades intensivas, levando a aumento da mortalidade, do tempo de internação hospitalar, de custos e dano cognitivo tardio. As práticas de CTI afetam a incidência de *delirium* (Girard e cols., 2010).

Ainda segundo o “guideline” de 2013 da “Critical Care”, permanece conflitante a relação entre o desenvolvimento de *delirium* e o uso de opióides em adultos internados em UTI (unidade de terapia intensiva). Benzodiazepínicos podem ser fatores de risco para que esses pacientes desenvolvam *delirium* (nível de recomendação B). Ainda são insuficientes os dados para se relacionar o uso de propofol ao *delirium*. A dexmedetomidina, quando comparada aos benzodiazepínicos, parece estar associada à menor prevalência de *delirium* em pacientes acoplados à prótese ventilatória (nível de evidência B).

No entanto, apesar da aparente vantagem do uso de propofol e dexmedetomidina neste perfil de doentes, os benzodiazepínicos continuam importantes no manejo da agitação, ansiedade, convulsão, abstinência ao álcool ou a benzodiazepínicos. Também são importantes quando é necessário aprofundamento da sedação, amnésia ou quando associados a outras classes de medicações para redução de doses.

Historicamente, benzodiazepínicos (midazolam, lorazepam, etc) e propofol foram mais usados para sedar pacientes em unidades de terapia intensiva. Alguns “guidelines” recomendam o uso de midazolam para sedações curtas; lorazepam para tempo mais prolongado e propofol quando se deseja despertares intermitentes (Barr e cols., 2013).

Ainda assim, propofol e midazolam continuam sendo as drogas dominantes para uso em sedação de pacientes críticos (Arnold e cols., 2010). A dexmedetomidina, aprovada para uso nos Estados Unidos em 2002, tem sido mais frequentemente usada. A tabela 4.3 abaixo compara diferenças farmacológicas entre estes sedativos.

<i>Agentes</i>	<i>Início de ação</i>	<i>Meia-vida de eliminação</i>	<i>Metabólitos ativos</i>	<i>Dose de infusão (IV)</i>	<i>Dose de Manutenção (IV)</i>	<i>Efeitos adversos</i>
<i>Midazolam</i>	2-5 min	3-11 h	Sim	0,01-0,05 mg/kg	0,02-0,1 mg/kg/h	Depressão ventilatória/Hipotensão
<i>Lorazepam</i>	15-20 min	8-15 h	Não	0,02-0,04 mg/kg	0,02-0,06 mg/kg cada 2-6 h	Idem, nefrotoxicidade
<i>Diazepam</i>	2-5 min	20-120 h	Sim	5-10 mg	0,03-0,1 mg/kg cada 0,5-6 h	Idem, flebite
<i>Propofol</i>	1-2 min	Uso curto prazo: 3-12 h	Não	5 µg/kg/min em 5 min	550 µg/kg/min	Dor à injeção, Hipotensão, pancreatite, Síndrome do Propofol
<i>Dexmedetomidina</i>	5-10 min	1,8-3,1 h	Não	1 µg/kg em 10 min	0,2-0,7 µg/kg/h	Bradycardia, Hipotensão

Tabela 4.3 – Farmacologia das medicações sedativas. (Barr e cols., 2013)

Benzodiazepínicos ativam os receptores inibitórios de ácido gama aminobutírico (GABA) cerebrais. Têm efeitos ansiolítico, sedativo, de amnésia e anticonvulsivante. Porém não apresentam atividade analgésica. Por isso, muitas vezes são associados a opióides (Barr e cols., 2013).

Os benzodiazepínicos sofrem metabolização hepática. O despertar de pacientes sedados com benzodiazepínicos pode ser retardado por disfunção hepática, idade avançada e insuficiência renal (Barr e cols., 2001).

Propofol é um sedativo intravenoso que se liga a múltiplos receptores do Sistema Nervoso Central (SNC), como GABA_a, glicina, receptores nicotínicos e muscarínicos, interrompendo a transmissão nervosa. Ele apresenta efeitos sedativos, hipnóticos, ansiolítico, antiemético, faz amnésia e tem propriedades anticonvulsivantes (Barr e Donner, 1995). Em unidades de terapia

intensiva, a propriedade de amnésia do propofol, em baixas doses de sedação, parece ser inferior a dos benzodiazepínicos (WeinBroum e cols., 1997).

O propofol é altamente lipossolúvel e atravessa rapidamente a barreira hemato-encefálica, resultando em rápido início de ação. Devido a sua lipossolubilidade, rapidamente se redistribui para tecidos periféricos. A rápida redistribuição, combinada ao alto clearance hepático e extra-hepático, acarreta em despertar rápido após curtos períodos de administração. Devido a curta duração de seu efeito sedativo, é uma droga útil para pacientes que requerem despertares frequentes ou avaliações do *status* neurológico (Tanios e cols., 2009). No entanto, a administração de propofol por longos períodos pode levar à saturação de tecidos periféricos e à síndrome da infusão do propofol, caracterizada por falência ou arritmias cardíacas, insuficiência renal, acidose metabólica, hipertrigliceridemia e rabdomiólise (Barr e cols., 2013).

A dexmedetomidina é um agonista seletivo dos receptores α_2 , que apresenta propriedades sedativas, simpatolítica, analgésica, diminui consumo de opióide, porém sem aparente propriedade anticonvulsivante. Suas propriedades sedativas diferem consideravelmente dos demais agentes citados acima. Os pacientes sedados com esta droga interagem mais, são mais facilmente despertáveis e apresentam mínima depressão respiratória.

A dexmedetomidina é rapidamente redistribuída em tecidos periféricos e metabolizada pelo fígado. Apesar de ser aprovada nos EUA para sedações curtas, em pacientes de CTI (< 24 h), na dose máxima de 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, muitos estudos demonstram eficácia e segurança quando administrada em doses maiores (até 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$), por período maior de 24 h (até 28 dias) (Shehabi e cols., 2010).

Seus principais efeitos colaterais são hipotensão e bradicardia. Como não afeta de forma significativa o drive respiratório, é um dos poucos sedativos aprovados nos EUA para sedar pacientes que não estão entubados em unidades intensivas.

As propriedades analgésicas da dexmedetomidina permanecem controversas. Apesar da localização de receptores α_2 nas regiões dorsal da medula e supra-espinhal, foram documentados efeitos analgésicos não espinhais, relacionados à dexmedetomidina (Barr e cols., 2013).

Conforme mencionado anteriormente, foi proposta a menor prevalência de *delirium* em pacientes sedados com dexmedetomidina, em comparação ao midazolam (Barr e cols., 2013).

Todas estas medicações apresentam importantes efeitos sobre o sistema imune, a maioria delas parece diminuir a imunidade inata, com exceção dos α_2 agonistas. Os opióides estão relacionados também à imunidade adaptativa, conforme abordaremos a seguir. Esse aspecto é relevante, sobretudo em pacientes infectados e internados em unidades intensivas. Sabendo-se ainda da importante conexão entre o sistema imune e nervoso central, via neural e

via humoral (Konsman e cols., 2002), existe a possibilidade do uso destas medicações em pacientes sépticos interferir com o desfecho neurológico.

4.7) Conexões entre o Sistema Imune e o Sistema Nervoso Central

Diante de uma infecção, o sistema imune periférico é capaz de conectar-se com o Sistema Nervoso Central via neural e humoral (Konsman e cols., 2002). Neutrófilos e macrófagos, ativados pelo contato com o microorganismo invasor, secretam citocinas pró-inflamatórias, como IL1 β , TNF α e IL-6 (McCusker e Kelley, 2013). Estas citocinas podem atingir o Sistema Nervoso Central via vagal e estimular receptores específicos (como, por exemplo, o receptor para IL1 β) (Ek e cols., 1998). A via humoral, por sua vez, pode estimular regiões cerebrais que não apresentam barreira hemato-encefálica (Konsman e cols., 2002). A informação transmitida estimula o cérebro a produzir o mesmo padrão de citocinas pró-inflamatórias que a periferia (Dantzer, 2004). Dentre as citocinas pró-inflamatórias, IL1 β é considerada um dos principais reguladores da resposta sistêmica à infecção; uma vez que induz componentes da fase aguda, provocando febre, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, alterações de comportamento, depressão. Os componentes associados a mudanças de comportamento parecem não ser induzidos pela IL-6 (Lenczowski e cols., 1999).

Dessa forma, diante de uma infecção, após o reconhecimento do patógeno, sinais precisam atingir o cérebro para que haja mudanças de comportamento. Existem 2 principais rotas: a via neural e a via humoral. A ligação de receptores de reconhecimento padrão (PRR) é capaz de ativar a via aferente vagal que envia sinais, via trato solitário ao hipotálamo e amígdala. As citocinas periféricas estimulam o cérebro a produzir o mesmo padrão de citocinas da periferia pela barreira hemato-encefálica. A figura 4.1, abaixo, representa estas 2 vias de sinalização (McCusker e Kelley, 2013).

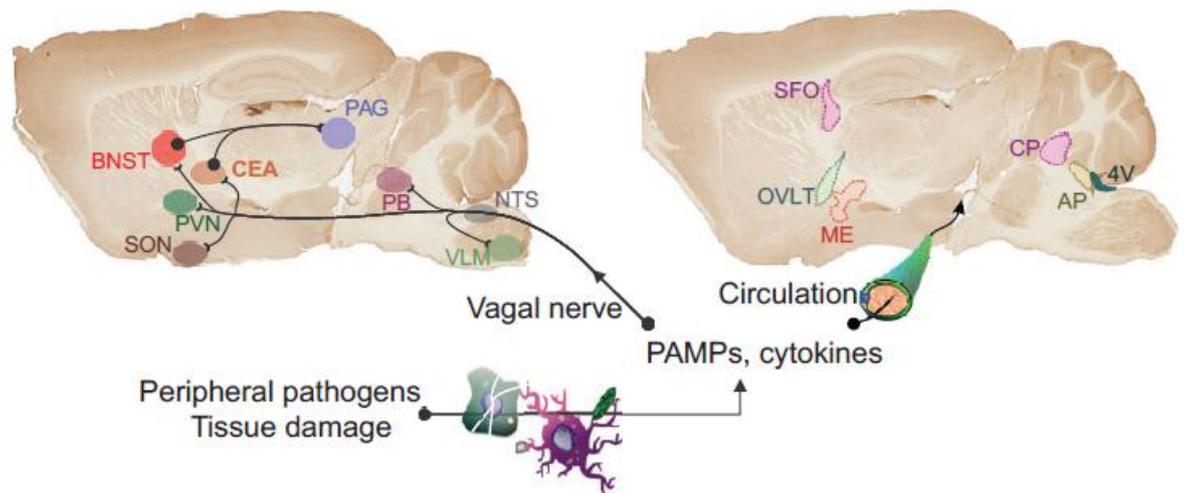


Figura 4.1 - Ativação neural e humoral do cérebro pela periferia. Via neural: a via aferente vagal projeta-se sobre o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo parabraquial (PB) e medula ventrolateral (VLM) antes de prosseguir para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), núcleo supraóptico do hipotálamo (SON), amígdala central (CEA) e estria terminal (BNST); projetando-se para a área periaquedutal cinzenta (PAG). / Via humoral: Citocinas e PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) da periferia atingem o cérebro. Ocorre transporte ativo pela Barreira hemato-encefálica (BBB), difusão de volume ou contato direto com células do parênquima cerebral via plexo coroide (CP) e órgãos circoventriculares (ME- eminência mediana, OVLT – *organum vasculosum da laminae terminalis*, AP- área postrema, SFO – órgão supraforncial) (McCusker e Kelley, 2013).

A expressão das citocinas pró-inflamatórias no cérebro é regulada por vários intermediadores moleculares, como antagonistas do receptor de IL-1, a citocina anti-inflamatória IL-10, fator de crescimento insulina símile1 (IGF-1), hormônios como glicocorticóides, vasopressina e alfa-melanotropina (Dantzer. 2004).

Células da glia (microglia e astrócitos) são consideradas as principais fontes de citocinas no cérebro, responsáveis pela mediação da resposta imune e inflamatória cerebrais (Amor e cols., 2010).

Ketamina, midazolam, propofol, isoflurano, pentobarbital parecem inibir a ativação de microglia induzida por lipopolissacarídeos (LPS), regulando a produção de IL1 β pelas células da microglia; além de afetarem a resposta ao estresse, via eixo hipotálamo- hipófise- adrenal (Tanaka e cols., 2013).

4.8) Impacto de Drogas Anestésicas e Sedativas sobre o Sistema Imune

Por muitos anos, pesquisadores vem se preocupando com o impacto de drogas anestésicas, analgésicas e sedativas sobre o sistema imune humano. O interesse surgiu a partir de observações clínicas de aumento de infecções pós cirúrgicas, depressão de medula óssea após exposição prolongada a anestésicos e pela associação entre sistema imune e controle do câncer (Stevenson e cols., 1990). Múltiplos estudos *in vivo* e *in vitro* foram realizados.

A primeira vista, poderia-se pensar que estudos *in vivo* seriam mais relevantes, por representarem eventos reais do sistema imune humano. No entanto, existem sérios problemas metodológicos nos testes, nesta área. Uma das principais dificuldades consiste em separar os efeitos de múltiplos fatores intra-operatórios, que interferem no sistema imune, dos efeitos diretos dos agentes anestésicos por si só. As alterações imunes podem ter associação com o trauma cirúrgico e a resposta endócrino metabólica ao trauma (Hogan e cols., 2011). Existem poucos estudos de exposição prolongada a anestésicos, na ausência de cirurgias. Neste sentido, o acompanhamento de pacientes sedados com drogas anestésicas em unidades intensivas, apesar de não excluir a interferência das comorbidades, mostra-se útil.

Os estudos *in vitro* também não são isentos de críticas. É questionável a relevância e aplicação dos testes *in vitro* para resultados de eventos clínicos *in vivo* (Dyson e Singer, 2009). Existem dificuldades de purificação e cultura de células imunes humanas retiradas de sangue periférico; além disso, essas células podem ter uma limitada correlação com eventos efetores do sistema imune.

4.8.a) Anestésicos Inalatórios

Anestésicos voláteis (como desflurano, isoflurano, sevoflurano) foram identificados como possíveis modificadores da resposta inflamatória à injúria tecidual. Porém, ainda não foi bem explorado o benefício da aplicação de anestésicos voláteis em modelos experimentais de sepse *in vivo*. Estudos anteriores foram tradicionalmente focados na injúria de isquemia e reperfusão. Em 2013, Herrmann e cols., mostraram associação entre administração de sevoflurano e desflurano, imediatamente após a indução do modelo de ligadura do ceco e perfuração, ou de sevoflurano 24 h após a ligadura do ceco e perfuração com redução da mortalidade (Herrmann e cols., 2013).

Existe também relacionamento entre anestésicos voláteis com neuroapoptose e neuroinflamação. Alguns estudos em cobaias demonstram aumento da neuroapoptose após exposição a uma variedade de anestésicos, podendo, inclusive, haver comprometimento tardio da função neurológica (Loepke e Soriano, 2008). A neuroapoptose (ou programação de morte celular) é capaz de eliminar cerca de 50-70% dos neurônios em desenvolvimento,

desempenhando um papel importante na formação do cérebro normal. Esse processo estabelece a estrutura e função do sistema nervoso central, remove células após insultos patológicos (como hipóxia e isquemia) e é capaz de eliminar neurônios após exposição a anestésicos, em animais imaturos. A caspase 3 (elemento central da cascata de enzimas proteolíticas apoptóticas) já foi identificada em várias regiões cerebrais, após 6 h de exposição anestésica ao Isoflurano. Da mesma forma, a exposição de camundongos neonatos a doses equipotentes de Desflurano ou Sevoflurano demonstrou perfis semelhantes de neurotoxicidade (Istaphanous e cols., 2011).

Outras drogas usadas em anestesia, além dos anestésicos inalatórios, vem sendo associados à neurodegeneração. Ketamina e Midazolam (administrados isoladamente ou em combinação) causam um aumento das taxas de neuroapoptose dose-dependente, com incremento dos níveis de caspase-3 ativada (Young e cols., 2005).

4.8.b) Benzodiazepínicos

O midazolam exerce suas ações via receptores centrais e periféricos (Zavala e cols., 1992). A expressão de receptores periféricos na superfície de macrófagos parece interferir com as funções pró-inflamatórias e antibacterianas dos macrófagos, via bloqueio de produção de ânions superóxidos e citocinas inflamatórias IL-1, TNF e IL-6 (Taupin, e cols., 1991). Tanto o midazolam, quanto o propofol, modulam o transporte e secreção também de IL-8 (Lisowska e cols., 2013). Estudos *in vitro* mostram que a ativação de leucócitos com lipopolissacarídeos, na presença de propofol e midazolam por 20 h, diminui a liberação extracelular de IL-8, podendo aumentar o risco de infecções no pós-operatório (Galley e cols., 1998).

Além das citocinas, o óxido nítrico é outro mediador pró-inflamatório importante em várias doenças. No choque séptico, a produção excessiva de óxido nítrico parece estar envolvida com lesão tissular (Chang e cols., 2002). Estudos mostram que a ciclooxigenase 2 (COX-2) e a enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (ambas induzidas em macrófagos por estímulos pró-inflamatórios) apresentam um papel importante tanto na inflamação, como na tumorigênese (Hla e cols., 1993). O midazolam parece exercer atividades anti-inflamatória também pela inibição de iNOS e COX-2, possivelmente por suprimir NF- κ B em macrófagos ativados por LPS (Kim e cols., 2006).

Midazolam interfere ainda com células dendríticas, inibindo sua função de apresentação de antígenos e ativação dos linfócitos T (Ronquilly, 2011).

Wei e cols., mostraram, em 2010, em estudo *in vitro*, por citometria de fluxo, efeito de supressão do diazepam sobre a produção de IFN γ pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ e sugeriram que o efeito de supressão da função dos linfócitos T fosse via receptores periféricos de benzodiazepínicos.

O midazolam parece inibir a função de maturação das células dendríticas murinas (importantes para indução e regulação da resposta imune adaptativa), bem como interfere com a indução da imunidade de células T helper por células dendríticas (Ohta e cols., 2011).

A resposta inflamatória em queimados pode sofrer influência da administração de midazolam. Camundongos queimados tratados com midazolam *in vivo* mostraram menores níveis séricos de IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10. Na análise da ferida (queimadura), TNF α estava diminuída e IL-10 aumentada. Na análise das quimiocinas da ferida, dosagens de MCP-1 e KC não foram influenciadas (Babcock e cols., 2012).

O uso *in vivo* de midazolam foi associado à diminuição de IL-1 β , IL-6 e TNF α e aumento da concentração sérica de IL-8, em pacientes críticos (Helmy e Al-Attiyah, 2001).

Dessa forma, os benzodiazepínicos parecem exercer efeitos de inibição da resposta imune inata e adaptativa, o que poderia levar a um aumento de mortalidade em alguns modelos experimentais de infecção. Grande parte destes efeitos se dá pela presença de receptor periférico de benzodiazepínicos em células do sistema imune.

4.8.c) Propofol

Apesar dos efeitos de sedativos sobre o sistema imune serem mais investigados com neutrófilos e macrófagos, alguns sedativos parecem modular as funções de linfócitos T associadas ao antígeno 1 (LFA-1). LFA-1 é uma molécula de adesão que regula a função imune de linfócitos. Inclusive, a produção de IL-2 pode ser reduzida, caso esta molécula não se ligue ao seu ligante, a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Estudos sugerem que o propofol iniba a ligação de LFA-1 a ICAM-1, suprimindo a proliferação de linfócitos T e a produção de IL-2. No entanto, nem a dexmedetomidina nem o midazolam parecem compartilhar estes efeitos imunológicos (Yuki e cols., 2011).

A incubação *in vitro* de neutrófilos do sangue e do peritônio de ratos submetidos ao modelo de CLP com propofol e midazolam mostrou depressão da produção de H₂O₂, sobretudo pelos neutrófilos incubados com propofol (Inada e cols., 2001).

Propofol também parece suprimir a função de macrófagos, possivelmente por inibir o potencial de membrana da mitocôndria e a síntese de adenosina trifosfato (Chen e cols., 2003).

Wheeler e cols., em 2011, associaram o comprometimento da função imune à ativação de receptores gabaérgicos (GABA_a) em monócitos.

Midazolam e propofol são drogas amplamente utilizadas para sedação de pacientes, por períodos mais prolongados, em unidades de terapia intensiva. Ambos parecem inibir a resposta imune *in vitro*. Por isso, quando usados por longos períodos em pacientes, existe a preocupação quanto à relevância clínica *in vivo* destas alterações imunológicas. Quatro horas de infusão de propofol, em modelos de coelho, há aumento da colonização de pulmões e baço por *E. coli*,

talvez pelo veículo lipídico carreador (Kelbel e cols., 1999; Kelbel e Weiss, 2001). Quarenta e oito horas de infusão contínua de propofol provocou aumento de IL-1 β , IL-6, TNF α em pacientes críticos; enquanto que o midazolam levou à diminuição. Ambos diminuíram a concentração sérica de IL-8. Propofol diminuiu mais a concentração de IL-2 e aumentou os níveis de IFN γ (Helmy e Al-Attiyah, 2001).

Portanto, dados *in vivo* e *in vitro* sugerem efeitos antiinflamatórios do propofol, afetando sobretudo a imunidade inata.

4.8.d) Opióides

Quanto aos opióides, muito utilizados para analgesia em anestesia e terapia intensiva, foram descritos efeitos mútuos sobre o sistema imune, tanto estimulatórios, quanto inibitórios. Eles exercem seus efeitos via receptores (μ , κ , δ), periféricos e centrais, presentes em células nervosas (como as células da glia) e do sistema imune, ou via sistema nervoso autonômico e central. (Lisowska e cols., 2013).

Os opióides regulam a resposta inata e adaptativa, interferindo com a síntese de citocinas (Finley e cols., 2008), imunoglobulinas, linfócitos “Natural Killer” (células exterminadoras naturais) e a fagocitose (Roy e cols., 2011). Existe a possibilidade de diferentes subtipos de receptores opióides serem responsáveis por regulações anti ou pró-inflamatórias. Sugere-se que receptores opióides kappa (κ) induzam respostas antinflamatórias através da modulação da síntese de citocinas, quimiocinas e da expressão de receptores de quimiocinas. Enquanto a ativação dos receptores mi (μ) favoreceria a resposta pró-inflamatória (Finley e cols., 2008).

O tratamento crônico com morfina influencia o balanço da resposta imune Th1/Th2. A morfina induz produção de TGF β (“Transforming Growth Factor beta”), que leva a aumento das interleucinas IL-4 e IL-5 e diminuição de IL-2 e IFN γ em células estimuladas *in vitro* (Roy e cols., 2001). Existe também correlação entre o tratamento a longo prazo com morfina, que pode levar à tolerância analgésica, requerendo maiores doses do opióide, e a diminuição de citocinas (IL-8, IL-12 e MIP-1 α) (Makimura e cols., 2011).

Mojadadi e cols., em 2009, demonstraram, em modelo animal, redução da imunidade celular, via inibição da atividade citolítica de linfócitos T, e reativação do vírus latente Herpes tipo 1 em camundongos, após administração aguda de morfina.

Os opióides têm efeitos pró-inflamatórios em células da glia, com liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF α ; independente da frequência e tempo de administração. A morfina parece estimular a liberação de reservas de citocinas, mas não a síntese. Algumas destas citocinas (como a IL-1) podem interferir com o potencial analgésico da morfina e facilitar a tolerância (Lisowska e cols., 2013).

Existem evidências do envolvimento de receptores “Toll-like” (TLR4 e TLR2) nos efeitos imunomodulatórios da morfina. As respostas de tolerância, hiperalgesia e depressão ventilatória estão relacionadas à atividade de receptores TLR4 das células gliais (Hutchinson e cols., 2010). O estímulo de TLR2 (importante na identificação de infecções por bactérias gram positivas) leva à síntese de TNF e IL-6, via sinalização por NF-κB. A morfina parece inibir a produção de TNF e IL-6 (Bonnet e cols., 2008). Ela regula, portanto, as vias de sinalização celular de macrófagos estimulados por TLR2 e TLR4, durante os estágios iniciais de reconhecimento de patógenos, através da inibição de receptores ou da via NF-κB (Franchi e cols., 2012).

Dessa forma, os efeitos anti-inflamatórios da morfina parecem ser mediados por diferentes vias de sinalização.

Sabendo-se da importância da imunidade no controle do câncer, o *British Journal of Cancer* publicou revisão recente (Boland e cols., 2014) com o objetivo de avaliar os efeitos do uso de opióides em pacientes com câncer. No entanto, apesar das evidências pré-clínicas, ainda faltam dados, na população clínica com câncer, para recomendações serem definidas.

Um dos principais metabólitos da morfina, a morfina 3-glicuronídeo, causa aumento da dor por estimular receptores TLR4 e liberação de IL-1 pelas células da glia. Tal efeito não foi observado com morfina 6-glicuronídeo (Lewis e cols., 2010).

Outro opióide, como o remifentanil, causa diminuição da relação IFN γ /IL-10, o que pode indicar um equilíbrio Th1/Th2. Concentrações de IL-6, IL-10, IL-2 e TNF não parecem se modificar significativamente com remifentanil, nem com fentanil (von Dossow e cols., 2008).

Portanto, as evidências *in vitro* indicam o efeito imunossupressor da administração aguda e crônica de opióides, na ausência de dor. Ainda faltam estudos dos efeitos dos opióides em organismos doentes ou com dor.

4.8.e) Dexmedetomidina

Ao contrário das demais drogas citadas, os alfa 2 agonistas parecem aumentar a imunidade inata e não interferir na imunidade adaptativa, apresentando perfil menos imunodepressor. Além disso, estão associados a menor incidência de piora nos desfechos neurológicos.

O estímulo alfa 2 aumenta a ativação de macrófagos, levando à resistência ao crescimento de *Mycobacterium avium*, possivelmente pelo aumento da produção de peróxinitrito (Weatherby e cols., 2003).

Em modelos *in vivo*, observamos diminuição das taxas de mortalidade e dos efeitos inflamatórios (TNF e IL-6), em ratos estimulados pela administração venosa da endotoxina *E. coli* e logo após tratados com dexmedetomidina (Taniguchi e cols., 2004). Também observamos, em modelo murino de ligadura do ceco e perfuração, aumento da sobrevida em

animais tratados preemptivamente com clonidina ou dexmedetomidina. Isso parece acontecer pela conexão com o sistema muscarínico e inibição do tônus simpático, bem como pela modulação da produção de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e TNF α) pelos alfa 2 agonistas (Hofer e cols., 2009). Em 2009, Quiao e cols., verificaram melhora da mortalidade em ratos submetidos ao CLP e sedados com midazolam ou dexmedetomidina e postularam o benefício da dexmedetomidina em relação ao benzodiazepínico, pelo fato de o alfa 2 agonista reduzir mais a produção de IL-6 no sangue e a apoptose celular.

Dessa forma, tendo por base a importante correlação entre os sistemas nervoso central e imune e a diversidade de efeitos provocados pelas drogas anestésicas sobre o sistema imune, pretendemos estudar os efeitos do midazolam e da morfina em um modelo experimental de sepse que se aproxime do cenário clínico. Escolhemos o modelo de ligadura do ceco e perfuração por se aproximar ao quadro de peritonite fecal na apendicite supurada, sendo considerado padrão-ouro dentre os modelos murinos de sepse abdominal (Wichterman e cols., 1980; Dyson e Singer, 2009).

5.0) Objetivos

5.1) Objetivo Geral

- Reproduzir um modelo experimental de sepse em animais, que se aproximasse do que ocorre no cenário humano, com o intuito de testar efeitos do uso de midazolam e morfina para sedar pacientes sépticos. Para isso, realizamos o modelo de ligadura do ceco e perfuração (CLP), seguido da administração intraperitoneal de midazolam ou morfina.

5.2) Objetivos Específicos

- Comparar perfis de morbimortalidade entre os grupos, através da taxa de mortalidade, curva de sobrevida, escores clínicos de sepse e análise bioquímica;

- Comparar padrões de resposta inflamatória precoce (24 h) entre os grupos, a partir da celularidade total e diferencial, Unidades Formadoras de Colônia (CFU) e das dosagens de citocinas inflamatórias no lavado peritoneal e no plasma;

- Comparar perfis de resposta inflamatória precoce no Sistema Nervoso Central, pela dosagem de citocinas inflamatórias cerebrais, ativação de micróglia e detecção de PSD95.

6.0) Materiais e Métodos

6.1) Animais

Foram utilizados cerca de 383 camundongos suíços adultos, machos, pesando 20- 25 g, provenientes da Fundação Oswaldo Cruz. Todos foram adequadamente vermifugados e mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade (com ciclos de 12 h de claro/escuro), no Biotério do Pavilhão Ozório de Almeida. Foram ofertados água e ração, sem restrições dietéticas, *ad libitum*, exceto durante os protocolos experimentais. Houve aprovação prévia pelo Comitê de Ética para pesquisa em animais (CEUA FIOCRUZ: LW 36/10).

6.2) Ligadura e Perfuração do Ceco (CLP)

Os camundongos receberam anestesia geral inalatória com isoflurano (Cristália ®) administrado por meio de vaporizador calibrado, na dosagem de 1.0 concentração alveolar mínima (CAM). Realizou-se incisão da parede abdominal cuidadosa, exposição do ceco e identificação da válvula íleo-cecal. O ceco foi ligado abaixo da válvula íleo-cecal, tendo sido realizadas 2 perfurações (uma ao lado da outra) com agulha de calibre 18 gauge (G) (“agulha rosa”), seguidas de ligeira compressão para extravasamento de fezes na cavidade peritoneal (grupo CLP de 2 furos) ou 4 perfurações com o mesmo calibre de agulha, seguidas de ligeira compressão (CLP de 4 furos); após as quais o ceco foi reintroduzido na cavidade abdominal. Em seguida, procedemos o fechamento por planos (aponeurose e pele separadamente) com fio de sutura mononylon número 3,0. A figura abaixo (figura6.1), retirada de estudo feito por Rittirsch D e cols., 2009, representa as etapas de realização deste modelo (abertura, identificação do ceco, ligadura, punção com agulha “verde” calibre 21 gauge e fechamento).



Figura 6.1 – Etapas do CLP (Rittirsch D e cols., 2009).

Os animais chamados de “Sham” ou falso operados (controles) são submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém apenas com a exposição e reintrodução do ceco para a cavidade abdominal (sem ligadura e perfuração). Todos receberam, ao final do procedimento, reposição volêmica com 1 ml de salina estéril (soro fisiológico 0,9%) via subcutânea.

Os animais submetidos ao CLP de 2 furos receberam antibióticoterapia com meropenem 10 mg/kg via intraperitoneal diluído em volume de 0,5 ml de salina estéril por animal, nos intervalos de 6 h, 24 h e 48 h, quando eram também avaliados os escores clínicos de sepse (imediatamente antes da administração das doses de antibiótico). Aqueles submetidos ao CLP de 4 furos receberam meropenem 30 mg/kg intraperitoneal, diluído em 0,5 ml de salina, nos mesmos intervalos, sendo avaliados pelos mesmos escores clínicos. Os animais Sham receberam 0,5 ml de salina estéril via intraperitoneal nos mesmos intervalos, quando eram igualmente avaliados seus escores.

6.3) Tratamento com Midazolam ou Morfina

Após a realização da cirurgia, os animais (Sham e CLP) foram randomizados para receber, 5 h após, dose única de midazolam (solução injetável na concentração de 5 mg/ml da Cristália ®) de 40 mg/kg via intraperitoneal diluído em volume total de 0,5 ml de salina estéril ou dose única de morfina (solução injetável, concentração de 10 mg/ml, Cristália ®) 80 mg/kg via intraperitoneal diluída em volume total de 0,5 ml de salina estéril ou apenas 0,5 ml de salina estéril via intraperitoneal (controle negativo das drogas anestésicas/sedativas).

6.4) Avaliação da Morbimortalidade

Uma hora após a administração das drogas, foi avaliado o escore de sedação dos animais.

O grau de sedação foi avaliado de acordo com a escala de Boast et al (Boast e cols., 1988) adaptada por Inada T e cols., 2004. Conforme esta escala, os animais receberam graduações de 0 quando estavam normais até 3 na ausência de “righting reflex” (>10 segundos), vide tabela abaixo. Este reflexo é observado ao colocarmos o animal de “barriga para cima” e cronometrarmos o tempo que leva para reassumir sua postura normal sobre 4 patas. Faz-se, normalmente, a triplicata dos valores de cada animal.

Escore	Características
0	Animal deambula e tem reflexo postural “Righting reflex” normais
1	Andar cambaleante, reflexo postural com latência < 2 segundos
2	Latência do reflexo entre 2-10 segundos
3	Ausência do reflexo, “Righting reflex” > 10 segundos

Tabela 6.1 – Escore de sedação.

O escore clínico, adaptado a partir do escore publicado por Araújo CV e cols., em 2012, foi colhido após 24 h e 48 h do procedimento cirúrgico. Era composto por 11 itens, onde a presença ou ausência de cada um deles pontuava 1 ou 0, conforme tabela abaixo.

Itens	Presença (1) ou Ausência (0)
Piloereção	
Lacrimação ou Fechamento palpebral	
Abdomen contraído	
Frequência Respiratória alterada	
Capacidade de explorar o ambiente alterada	
Perda da alerta ao escape	
Alterações locomotoras	
Alterações de fezes	
Alteração de temperatura corporal	
Diminuição da força ao agarrar	
Turgor comprometido	
SOMA	

Tabela 6.2 – Escore clínico de sepse.

Os animais com escore 0 eram considerados saudáveis. Sepse leve para escore ≤ 3 , sepse moderada escore 4-7, sepse severa escore 8-11.

A taxa de sobrevivência foi acompanhada durante 15 dias. Separamos um grupo de animais para análise dos parâmetros de morbimortalidade e outro para análises precoces de 24 h. Desta forma, analisaremos um total de 6 grupos nas avaliações precoces (24 h) e tardias (até 15 dias): “Sham + Salina”, “Sham + Midazolam”, “Sham + Morfina”, “CLP + Salina”, “CLP + Midazolam”, “CLP + Morfina”.

6.5) Análises de 24 horas

Alguns animais foram sacrificados com sobredose de isoflurano via inalatória, para coletas de lavado peritoneal, sangue periférico, sangue central e cérebro 24 h após o CLP de 2 furos. Para o lavado peritoneal, foram injetados 3 ml de tampão fosfato salino (PBS), diluído 1 vez, sendo colhido de volta cerca de 1,5-2 ml. O sangue central foi colhido por meio de punção cardíaca (1 ml), em seringa de insulina contendo 0,1 ml de citrato 3,2% (anticoagulante). Sangue periférico colhido da cauda do animal. O lavado peritoneal foi colhido dentro do fluxo, para evitar contaminação.

Foram analisados Unidades formadoras de colônias (CFU) do lavado peritoneal, celularidade total e diferencial do lavado peritoneal e do sangue periférico. Para realização do CFU, o lavado foi semeado em placas contendo Ágar Tripton de Soja (TSA), colocadas na estufa a 37°C, sendo contadas as unidades 24 h após a incubação.

O lavado foi centrifugado à velocidade de 1500 rpm por 10 minutos e o sangue à 4500 rpm por 5 minutos para coleta dos sobrenadantes, seguida de análise das citocinas inflamatórias e da bioquímica do plasma (creatinina, albumina, aspartato-aminotransferase e alanina-aminotransferase).

Após coleta de sangue e lavado, o animal foi perfundido durante 5 minutos com salina estéril, sendo, posteriormente, retirado o cérebro, dividido em 2 hemisférios, sem bulbo do tronco cerebral, nem cerebelo (excluídos). Um hemisfério foi armazenado em paraformaldeído 4% no freezer -80°C, para cortes histológicos e análise de imunohistoquímica. O outro hemisfério, separado em córtex e hipocampo, armazenados a -20°C, em criotubos, para análise de mediadores inflamatórios.

Foram dosadas as citocinas IL-6, IL1 β , MCP-1 do lavado peritoneal; IL1 β , MCP-1, IL-10 do sangue central e IL-6, MCP-1 do córtex cerebral, por meio de ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”), utilizando-se o kit de ELISA sanduíche da R&D systems®.

Para a dosagem das citocinas do córtex, um hemisfério foi homogeneizado e macerado, usando-se PBS1x, inibidor de protease e fosfatase e Triton 100 a 0,1%. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos e colhido o sobrenadante. Cerca de 50 μ l de cada amostra foi pipetado nos poços da placa de ELISA. Realizada a dosagem de cada amostra pelo kit BCA e ajustado por mg de proteína do córtex.

Na realização do método de ELISA, são aplicados cerca de 50 μ l do anticorpo de captura da citocina estudada por poço da placa (total de 96 poços). 24 h após, os poços são lavados com solução de PBS tween a 0,05%, para remover os anticorpos não aderentes à superfície da placa. Este procedimento é seguido de bloqueio com PBS com 2% de soro de albumina bovina por

1 h, a fim de evitar a ocorrência de ligações inespecíficas. A placa é lavada com PBS tween a 0,05% três vezes, após o bloqueio. São, então, aplicadas as amostras a serem analisadas e o anticorpo da citocina recombinante, diluído de forma seriada em cada poço da placa. Após 24 h (3º dia), a placa é lavada 4 vezes com PBS tween 0,05% e, posteriormente, aliquotado o anticorpo de detecção da citocina em questão (BD pharmigen®). Após 1 h, a placa é lavada novamente com PBS tween 0,05% 6 vezes e aplicamos a estreptavidina conjugada à peroxidase. Mais 30 minutos para nova lavagem e adição de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzina) da Sigma®, substrato da peroxidase. A seguir, utilizamos a solução de parada da reação contendo ácido sulfúrico 2 N, lida no comprimento de onda de 450 nm em leitora de microplacas. Os dados colhidos foram analisados pelo programa Softmax Pro5.

Para análise inflamatória do hipocampo, usamos a técnica de Western Blotting com anticorpos para detecção de PSD95, que marcam bandas de 80 KDa. O hipocampo isolado de um hemisfério cerebral foi homogeneizado com 150 µl de RIPA e centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos para coleta do sobrenadante. As amostras de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida por eletroforese a uma voltagem de 100 V. Foram transferidas em membrana de PVDF (3,3',5,5'-tetrametilbenzina) usando-se o aparelho de transferência "BioRad Trans-Blot Semi-Dry" a uma voltagem de 15 mA, durante 45 minutos. Após 2 h de bloqueio com tampão, a membrana era incubada com os anticorpos de interesse. Inicialmente, adicionou-se o anticorpo primário, incubado por 1 h, lavado 5 vezes por 5 minutos com TBS/T (solução tampão Tris acrescida de tween-20). Seguido pela adição do anticorpo secundário, incubado por meia hora e lavado também 5 vezes por 5 minutos com TBS/T. Fizemos a análise dos dados por intermédio do programa Image Studio, comparando a expressão de PSD95/βactina.

Para realização do procedimento de imunohistoquímica, os hemisférios cerebrais foram armazenados em solução de paraformaldeído 4% durante 7 dias e depois em sacarose 20% em PBS. As amostras foram congeladas e cortes histológicos de 40 µm foram obtidos em criostato. Em seguida, as seções foram lavadas em PBS e permaneceram em tampão de bloqueio (soro normal de cabra 5%, albumina de soro bovino 3% em solução salina tamponada com fosfato contendo 0,15% de Triton X-100) por uma hora à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com anticorpo primário em tampão de bloqueio e deixados em agitação por 16 h. Para marcação de micróglia, o anticorpo primário utilizado foi de coelho anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) (1:400). Após serem lavadas em PBS, as seções foram incubadas com anticorpo secundário de cabra Alexa 488 anti-igG de coelho (1:1000) em tampão de bloqueio por duas horas.

As lâminas foram montadas com meio de montagem (Vectashield) com DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) e fotografadas em microscópio de fluorescência (objetiva 20x) e em microscópio confocal (objetiva 60x). A quantificação foi realizada com auxílio do programa “Image J” e a comparação foi feita em regiões equivalentes do cérebro. As áreas analisadas incluem córtex, e hipocampo nas regiões CA1, CA3 e Giro Denteado.

6.6) Organograma

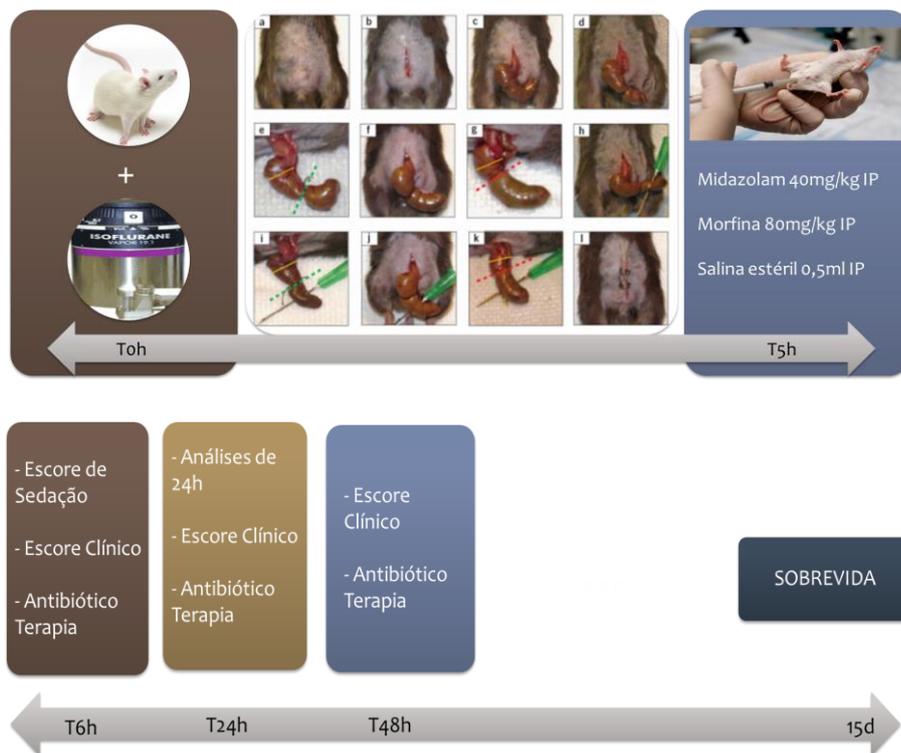


Figura 6.2 – Organograma do projeto.

6.7) Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados com auxílio dos programas “GraphPad Prisma 6” e Excel 2013. Os resultados foram representados como média e desvio padrão ou erro médio padrão. Foram analisados estatisticamente pelos testes NESTED ANOVA e Tukey (para comparação entre 2 grupos), nas análises de 24h. Os escores foram analisados como variáveis não paramétricas, pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney-Wilcoxon (nas comparações entre cada 2 grupos). Para análise das curvas de sobrevida (curva de Kaplan-Meier), foram utilizados os testes de Log-rank (Mantel-Cox), Gehan-Breslow-Wilcoxon e teste T Student (este último para comparação entre 2 curvas). Considerou-se significativo o valor de $p \leq 0,05$.

7.2) Morbimortalidade do Modelo de Ligadura do Ceco e Perfuração (2 Furos)

Os animais submetidos ao procedimento cirúrgico, seguido de tratamento com drogas anestésicas/sedativas, foram acompanhados durante 15 dias. Foram registradas as taxas de mortalidade de cada grupo, para que pudéssemos analisar e comparar diferenças de sobrevida pela curva de Kaplan-Meier (figura 7.2). Houve sobrevida de 100% para todos os grupos SHAM (SHAM+Salina, SHAM+Midazolam e SHAM+Morfina). A menor sobrevida foi do grupo CLP+Salina. Verificamos uma tendência importante de diminuição da mortalidade ao compararmos especificamente os grupos CLP+Salina *versus* CLP+Morfina, no entanto sem relevância estatística ($p= 0,055$).

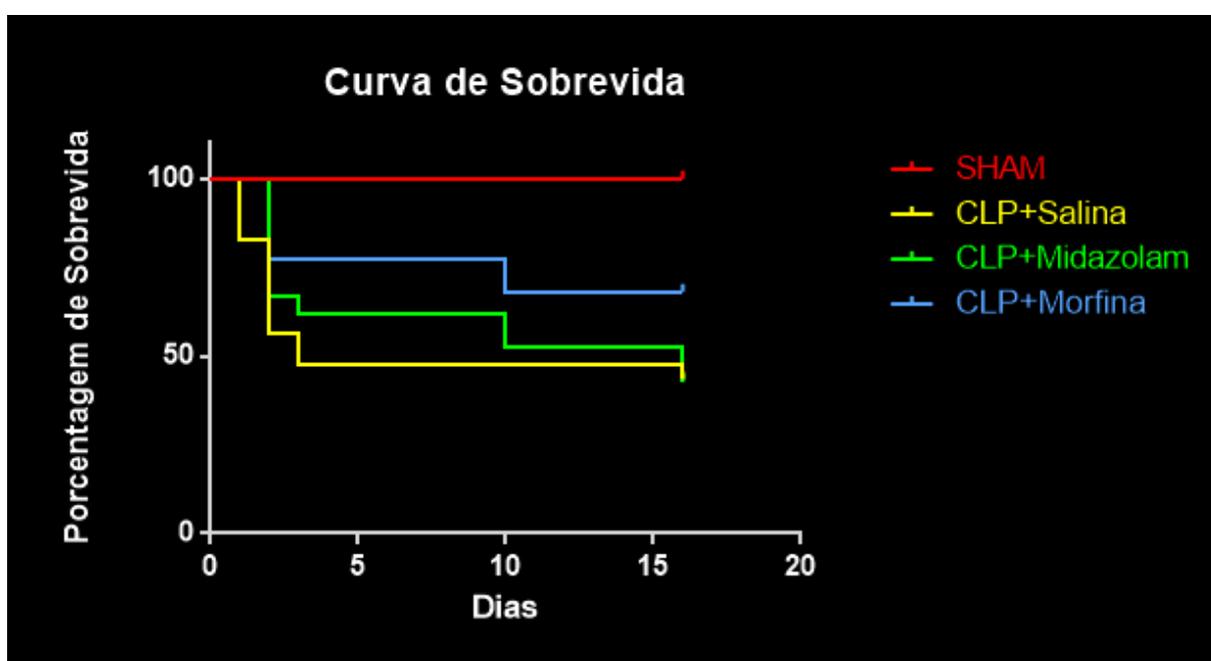


Figura 7.2 – Análise da sobrevida nos grupos CLP (2 furos) tratados com midazolam e morfina IP. Os camundongos foram submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP, 5 h após a cirurgia. Feito antibioticoterapia com meropenem 10 mg/kg IP 6 h, 24 h e 48 h, após a cirurgia. Anotamos os escores de mortalidade em 6 h, 24 h, 48 h, 7-10 dias e em 15 dias. N inicial de 8 animais para cada grupo SHAM e 21 animais para cada grupo CLP. A análise estatística das 4 curvas, pelos testes de Gehan-Breslow-Wilcoxon e Log-rank (Mantel-Cox), mostrou significância ($p<0,05$). A comparação entre os grupos CLP+Salina vs CLP+Morfina, pelo teste T student, não apresenta diferença ao nível de significância de 5%, mas apresenta a 5,5% ($p=0,055$).

Para análise da morbidade, utilizamos o escore clínico mencionado na metodologia. Estes itens foram avaliados 24 e 48 h após a cirurgia, sendo pontuado 0 para ausência ou 1 para

a presença de cada um deles. Todos os animais Sham mantiveram-se saudáveis, mesmo os tratados com as drogas. Os camundongos submetidos ao CLP desenvolveram doença, sendo a média dos escores de 24 h e 48 h maior para os tratados com midazolam, seguidos pelos grupos CLP+Salina e CLP+Morfina (figuras 7.3 e 7.4). A maioria dos animais apresentou sepse moderada.

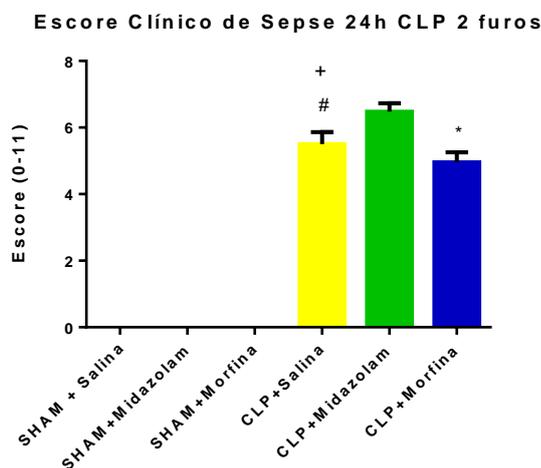


Figura 7.3 – Desenvolvimento de sepse moderada 24 h após a realização do modelo CLP com 2 furos. Os animais foram submetidos ao procedimento de CLP de 2 furos ou à exposição do ceco sem perfuração. Administrado midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP, 5 h após a cirurgia. O escore clínico foi avaliado 24 h após a cirurgia. N de 8 animais para cada grupo Sham e 21 animais para cada CLP. A avaliação estatística por meio do teste Kruskal-Wallis mostrou $p < 0,05$. Ao compararmos entre si 2 grupos, pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon, há diferença entre os grupos CLP+Salina vs SHAM+Salina (+), CLP+Salina vs CLP+Midazolam (#) e CLP+Midazolam vs CLP+Morfina (*), com $p < 0,05$.

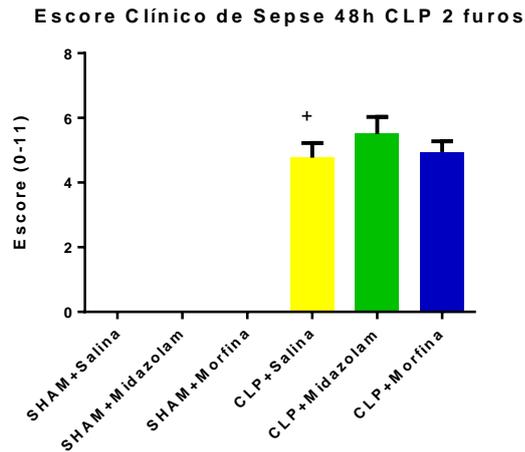


Figura 7.4 – Análise do escore clínico de sepsis 48 h após o procedimento de CLP de 2 furos.

Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados 5 h após, com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. O escore clínico foi medido 48h após o CLP, seguido de nova dose de antibiótico meropenem IP. N de 8 animais por grupo SHAM, 13 CLP+Salina, 14 CLP+Midazolam e 17 CLP+Morfina (devido à mortalidade de 24 e 48 h). A análise intergrupos, pelo teste de Kruskal-Wallis e, entre 2 grupos, pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon, comparando CLP+Salina vs SHAM+Salina (+) mostraram relevância estatística ($p < 0,05$).

7.3) Análises Inflamatórias de 24h (CLP 2 Furos)

Conforme explicitado em “Materiais e Métodos”, realizamos outro experimento onde parte dos animais foi sacrificada para coleta de material para análises inflamatórias, 24 h após o CLP de 2 furos.

Inicialmente, foi coletado sangue da cauda de cada camundongo e feito lavado peritoneal (LP), para análises da celularidade total e diferencial.

No sangue, observamos predomínio de mononucleares nos animais Sham. No lavado peritoneal, há predomínio de polimorfonucleares nos grupos submetidos ao CLP. Não observamos diferença estatística significativa no sangue dos animais tratados com midazolam e morfina em relação ao grupo CLP+Salina (figura 7.5). Ao avaliarmos o LP, notamos aumento da contagem de polimorfonucleares no grupo CLP tratado com midazolam. Há diferença significativa na comparação entre CLP+Midazolam versus CLP+Morfina (figura 7.6).

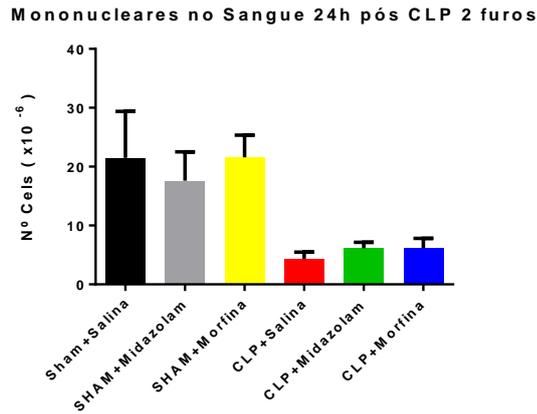


Figura 7.5 – Análise da contagem de mononucleares no sangue de animais submetidos ao CLP de 2 furos. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Colhido sangue 24 h após, para análise da celularidade diferencial. N de 6 animais SHAM e 8 CLP por grupo. A análise estatística mostrou significância com a aplicação do teste NESTED ANOVA, apontando evidências de diferenças de valores em função do tipo de cirurgia realizada ($p < 0,05$). Não houve significância na aplicação do teste Tukey.

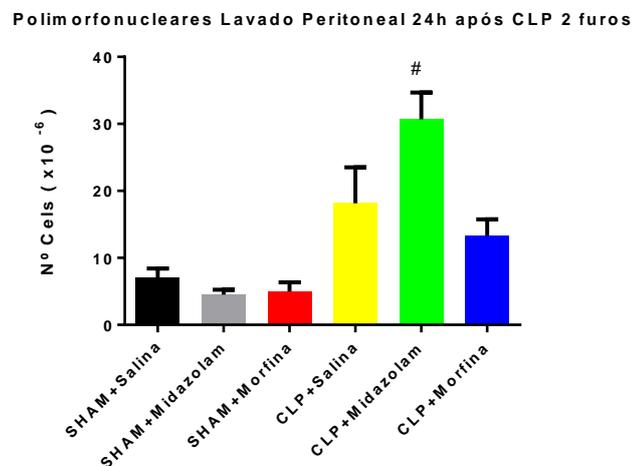


Figura 7.6 – Análise da contagem de polimorfonucleares no lavado peritoneal dos animais submetidos ao CLP de 2 furos. Camundongos submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Contagem diferencial do lavado peritoneal colhido 24 h após a cirurgia. N de 6 animais para os grupos SHAM e 8 animais para os grupos CLP. Houve diferença estatística entre os grupos pelo teste NESTED ANOVA e, entre 2 grupos, ao compararmos CLP+Midazolam vs CLP+Morfina, pelo teste Tukey ($p < 0,05$), marcado com # no gráfico.

Parte do lavado peritoneal foi cultivado em placas contendo TSA para contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Verificamos aumento das unidades nos grupos CLP, sendo que os grupos SHAM não apresentaram colônias. A tendência de aumento é maior no grupo CLP+Salina e menor no CLP+Morfina. Não houve, porém, alterações significativas após tratamento com midazolam nem morfina (figura 7.7).

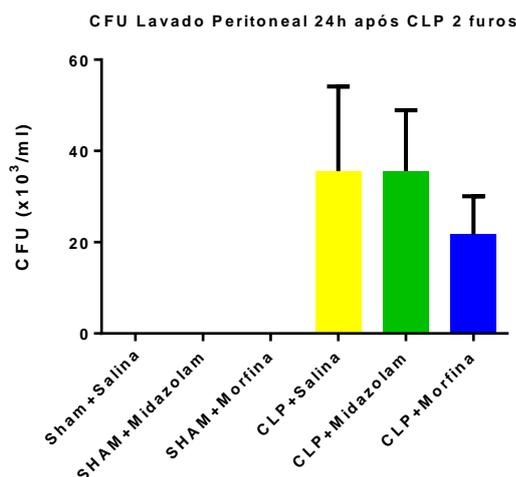


Figura 7.7 – Aumento de CFU peritoneal nos grupos CLP. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. CFU do lavado peritoneal colhido 24h após CLP de 2 furos. N de 6 animais por grupo. Ao compararmos os grupos, pelo teste NESTED ANOVA, há relevância estatística, apontando diferenças em relação ao tipo de cirurgia aplicada ($p < 0,05$). Não há diferenças pela aplicação do teste Tukey.

O lavado peritoneal foi centrifugado e colhido o sobrenadante para dosagem de citocinas inflamatórias por meio de ELISA. Da mesma forma, o sangue central, colhido por meio de punção cardíaca, para análise de citocinas pelo mesmo método e também para bioquímica do plasma.

Na análise bioquímica, há tendência de aumento da creatinina no grupo CLP tratado com midazolam, porém sem significado estatístico (figura 7.8). Há diminuição da albumina sérica nos grupos submetidos à cirurgia de CLP, com $p < 0,05$ (figura 7.9). Há também tendência de aumento das enzimas hepáticas Aspartato-aminotransferase (AST) e Alanina-transferase (ALT) nos grupos CLP, sobretudo no grupo CLP tratado com midazolam; com significado estatístico apenas para o aumento da enzima ALT, nos grupos submetidos ao CLP (figuras 7.10 e 7.11).

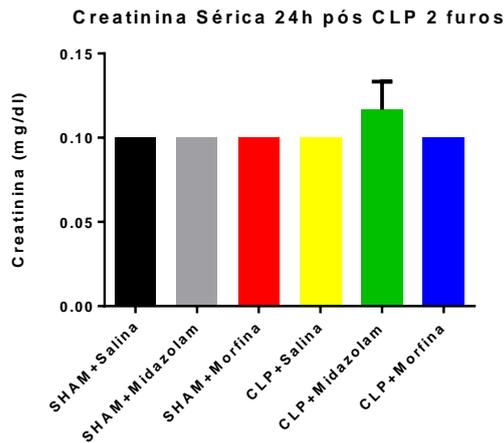


Figura 7.8 – Análise da creatinina sérica 24 h após CLP de 2 furos. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. 24h após o CLP, colhemos plasma destes animais. N de 6 animais por grupo em cada uma das análises. Não foram encontradas diferenças estatísticas pelos testes NESTED ANOVA e Tukey.

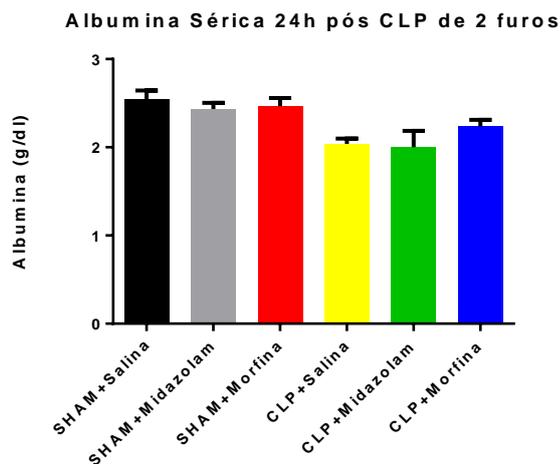


Figura 7.9 – Diminuição da Albumina sérica nos grupos CLP. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Colhido sangue 24 h após o CLP. N de 6 animais por grupo. Há diferenças intergrupos, pelo teste NESTED ANOVA, apontando para a influência do tipo de cirurgia realizada ($p < 0,05$). Não há relevância pela aplicação do teste Tukey.

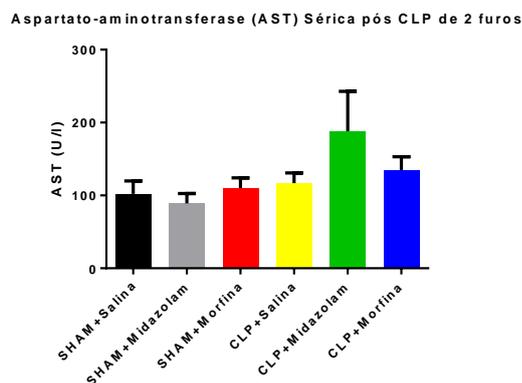


Figura 7.10 – Análise da enzima hepática AST sérica 24 h após CLP de 2 furos. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. N de 6 animais em cada grupo. Não encontramos diferenças estatísticas pelos testes de NESTED ANOVA nem Tukey.

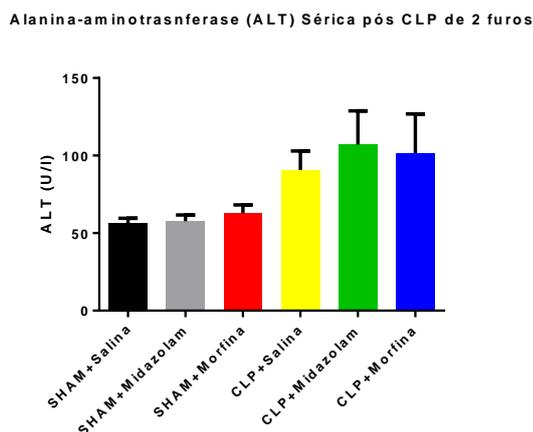


Figura 7.11 – Análise da ALT 24 h após CLP de 2 furos. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. N de 6 animais por grupo. As evidências apontam que há diferenças dos valores, pelo teste NESTED ANOVA, em função do tipo de cirurgia realizado (CLP), mas não conforme o tratamento aplicado após a cirurgia pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Na análise das citocinas do lavado peritoneal, nota-se aumento de todas as citocinas nos grupos CLP.

Em comparação com o CLP+Salina, os grupos tratados apresentam sempre menores dosagens de citocinas inflamatórias, apesar de essas dosagens não chegarem a se igualar às dosagens de citocinas dos grupos SHAM. Esta diferença é mais expressiva quando avaliamos

a IL-6 (figura 7.14), ao compararmos CLP+Salina com CLP+Morfina. O mesmo padrão de tendência ocorre na dosagem de MCP-1 (figura 7.12) e IL-1 β (figura 7.13), no lavado.

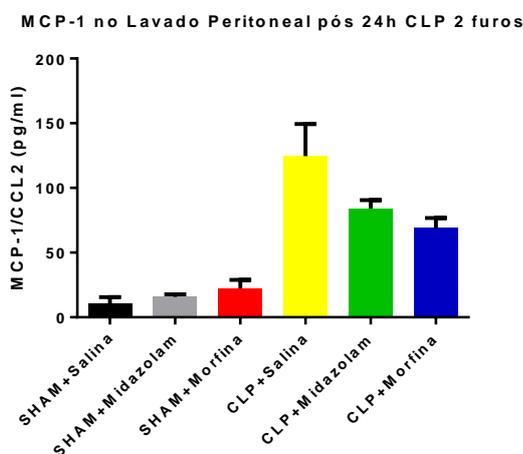


Figura 7.12 – Aumento da citocina MCP-1 ou CCL2 no LP dos grupos CLP. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Colhido LP 24 h após a cirurgia. N de 8 animais por grupo. A aplicação do teste de NESTED ANOVA mostrou $p < 0,05$ na análise intergrupos, com diferenças apontadas para o tipo de cirurgia (CLP), mas não para o tipo de tratamento medicamentoso, pelo teste Tukey.

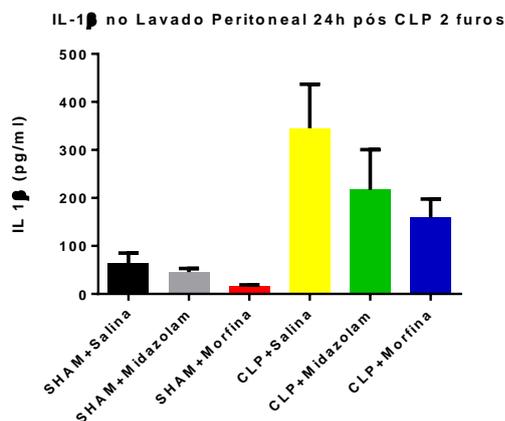


Figura 7.13 – Aumento da citocina inflamatória IL-1 β no LP dos grupos CLP. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Colhido LP 24 h após a cirurgia. N de 8 animais por grupo. Houve significado estatístico pelo teste NESTED ANOVA ($p < 0,05$), mas não pelo teste Tukey. Ou seja, parece haver influência do tipo de cirurgia realizada nos valores destas citocinas medidas no LP.

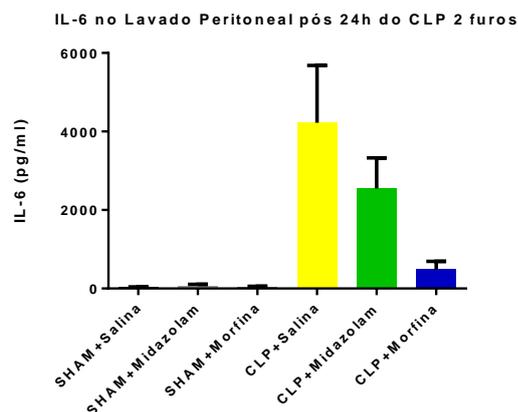


Figura 7.14 – Análise da citocina IL-6 no LP dos camundongos submetidos ao CLP de 2 furos. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Colhido LP 24 h após a cirurgia. N de 8 animais por grupo. Análise estatística mostrou relevância pelo teste NESTED ANOVA ($p < 0,05$), demonstrando influência do tipo de cirurgia realizada. Não há relevância estatística conforme o tratamento medicamentoso.

Ao analisarmos as citocinas IL-1 β , MCP-1 e IL-10 do sangue central, encontramos tendência de aumento de todas estas citocinas nos grupos submetidos ao CLP (figuras 7.15, 7.16 e 7.17). O tratamento com midazolam e morfina parece ter diminuído a produção de MCP-1 (figura 7.16).

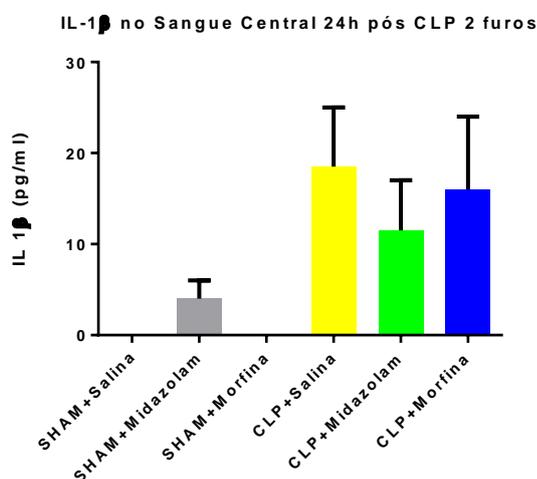


Figura 7.15 – Análise da citocina IL-1 β no sangue dos animais submetidos ao CLP de 2 furos. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Colhido sangue central 24 h após a cirurgia. N de 8 animais por grupo. A aplicação do teste NESTED ANOVA aponta para uma diferença significativa em função do tipo de cirurgia realizada ($p < 0,05$). Não há diferença estatística entre os tratamentos.

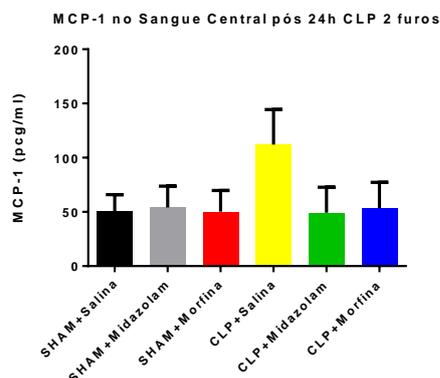


Figura 7.16 – Análise da citocina MCP-1 no sangue dos animais submetidos ao CLP de 2 furos.

Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Colhido sangue central 24 h após a cirurgia. N de 6 animais por grupo. Houve aumento de MCP-1 no sangue do grupo CLP+Salina, com diminuição das dosagens (a níveis comparáveis aos grupos SHAM) nos grupos CLP+Midazolam e CLP+Morfina, porém sem significado estatístico pelos testes NESTED ANOVA e Tukey.

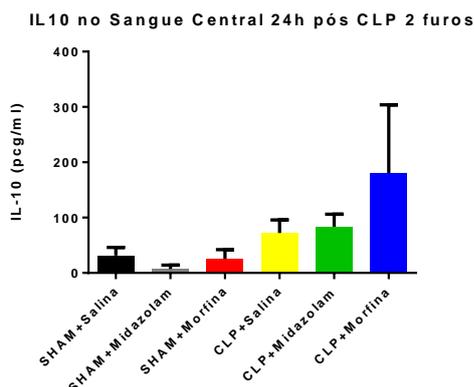


Figura 7.17 – Análise da citocina IL-10 no sangue central dos animais submetidos ao CLP de 2 furos.

Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Colhido sangue central 24 h após a cirurgia. N de 6 animais por grupo. Houve aumento de IL-10 no sangue dos grupos submetidos ao CLP, em relação aos grupos SHAM; sendo este aumento maior no grupo CLP+Morfina. No entanto, não houve significado estatístico pelos testes NESTED ANOVA e Tukey.

Também dosamos, por ELISA, as citocinas do córtex de um dos hemisférios cerebrais colhidos após a perfusão dos animais.

Nota-se um aumento das citocinas no cérebro dos camundongos dos grupos CLP, no caso das citocinas IL-6 e MCP-1. Ao avaliarmos especificamente a IL-6, os grupos CLP

tratados com midazolam e morfina chegam a atingir valores de citocina próximos aos do SHAM (figura 7.18). O tratamento com midazolam diminuiu a produção de MCP-1 (figura 7.19).

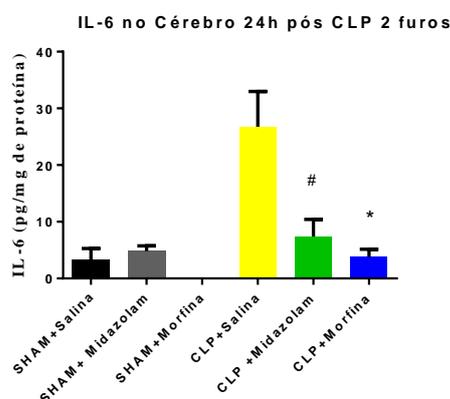


Figura 7.18 – Redução da citocina IL-6 cerebral nos animais CLP tratados com midazolam e morfina. Camundongos submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. 24 h após a cirurgia, os animais foram sacrificados e perfundidos, para coleta do córtex de um hemisfério cerebral e dosagem de citocinas. N de 8 animais por grupo. As evidências encontradas indicam que os tratamentos medicamentosos possuem comportamentos diferentes pelo teste NESTED ANOVA. Há variação estatística significativa também segundo o teste Tukey, ao compararmos os grupos CLP+Salina *versus* CLP+Midazolam (#) e CLP+Salina *versus* CLP+Morfina (*), com $p < 0,05$.

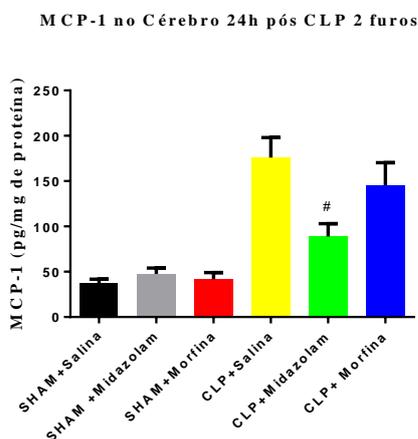


Figura 7.19 – Análise da citocina MCP-1 no córtex dos animais submetidos ao CLP de 2 furos. Camundongos submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. 24 h após a cirurgia, os animais foram sacrificados e perfundidos, para coleta do córtex de um hemisfério cerebral e dosagens de citocinas. N de 8 animais por grupo. Realizado teste de NESTED ANOVA, com significado estatístico, demonstrando interferência do tipo de cirurgia realizada e de pelo menos um tratamento medicamentoso. O # da figura representa diferenças estatística, pelo teste Tukey, entre os grupos CLP+Salina e CLP+Midazolam ($p < 0,05$).

Ao dosarmos a expressão da proteína sináptica PSD95 pela técnica de Western Blotting, observamos uma tendência de diminuição da expressão PSD95/ β actina no grupo CLP+Salina (figura 7.20). Nos grupos tratados com midazolam e morfina, há um aumento desta expressão. Este aumento é maior no grupo CLP+Morfina, onde a expressão de PSD95 quase se iguala à do grupo SHAM+Morfina (figura 7.21).

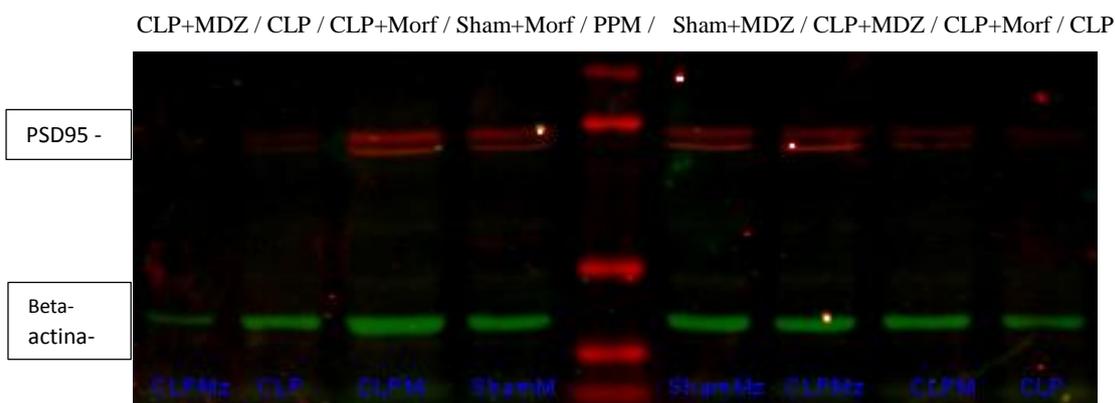


Figura 7.20 – Análise da expressão da proteína PSD95 por Western Blotting. Camundongos submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. 24 h após o procedimento, os animais foram sacrificados e perfundidos, para coleta do córtex de um hemisfério cerebral, sendo dissecada a região do hipocampo e feito dosagem PSD95 por Western. N de 2 animais por grupo CLP e 1 animal por grupo SHAM. Observa-se diminuição da intensidade de coloração na banda correspondente à proteína PSD95 nos grupos CLP, com aumento da intensidade mediante o tratamento com as drogas, sobretudo com a morfina.

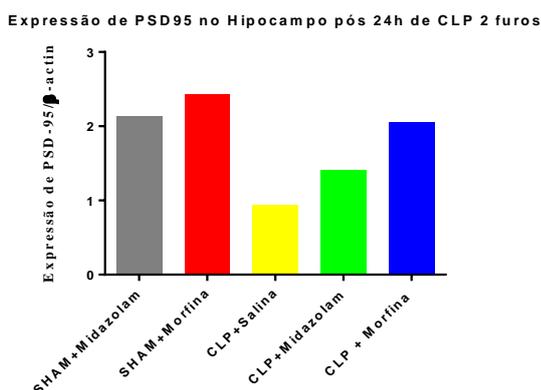


Figura 7.21 – Tendência de aumento dos níveis de PSD95 no hipocampo dos grupos CLP tratados. Camundongos submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. 24 h após o procedimento, colhido hipocampo e feito dosagem de PSD95 por Western. N de 2 animais por grupo. A quantificação das proteínas do gel pelo programa Image Studio mostrou diminuição da expressão de PSD95 no grupo CLP+Salina.

A quantificação da imunohistoquímica pelo programa Image J, mostrou aumento da ativação de micróglia pela marcação com anticorpo IBA-1 nos grupos CLP (figura 7.22). Apesar da tendência de diminuição da ativação nos grupos tratados, não houve significado estatístico. A figura 7.23 mostra foto representativa da ativação da micróglia no grupo CLP+Salina, em microscópio de fluorescência, e a figura 7.24, pela microscopia confocal.

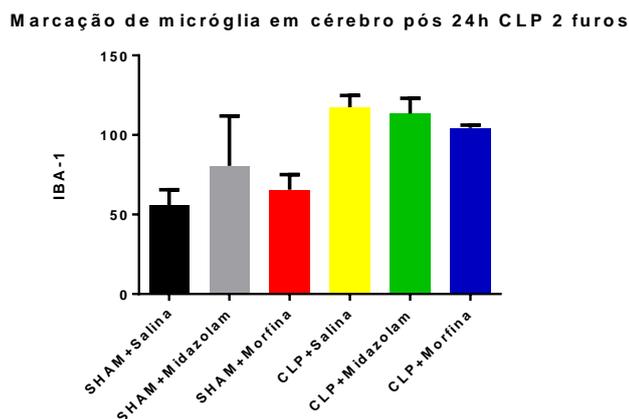


Figura 7.22 – Aumento da marcação da micróglia no grupo CLP. Animais submetidos ao CLP de 2 furos e tratados com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. 24 h após o procedimento, os animais foram sacrificados e perfundidos, para coleta de um hemisfério cerebral, para marcação de ativação de micróglia. N de 3 animais por grupo. Observamos aumento da concentração do anticorpo IBA-1 nos grupos CLP, com significância do tipo de cirurgia pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

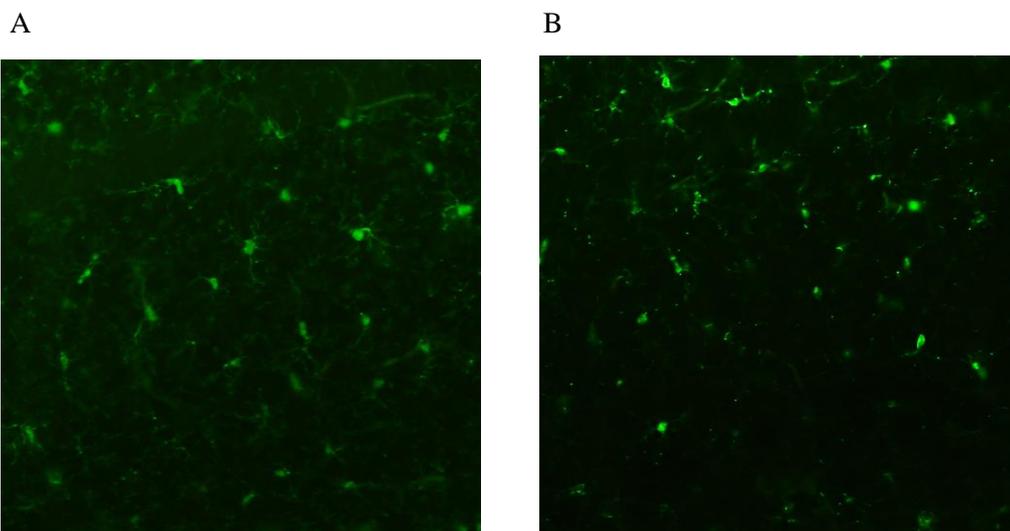


Figura 7.23 – Análise da ativação da micróglia por imunohistoquímica nos grupos SHAM+Salina e CLP+Salina (2 furos). Animais submetidos ao CLP de 2 furos. 24 h após, os animais foram sacrificados e perfundidos, para coleta de um hemisfério cerebral, para marcação de ativação de micróglia, usando-se anticorpo IBA-1. Foto tirada em microscópio de fluorescência, com aumento de 20x. A representa o grupo SHAM+Salina e B representa grupo CLP+Salina. Observa-se, em B, maior intensidade de coloração dos corpos celulares.

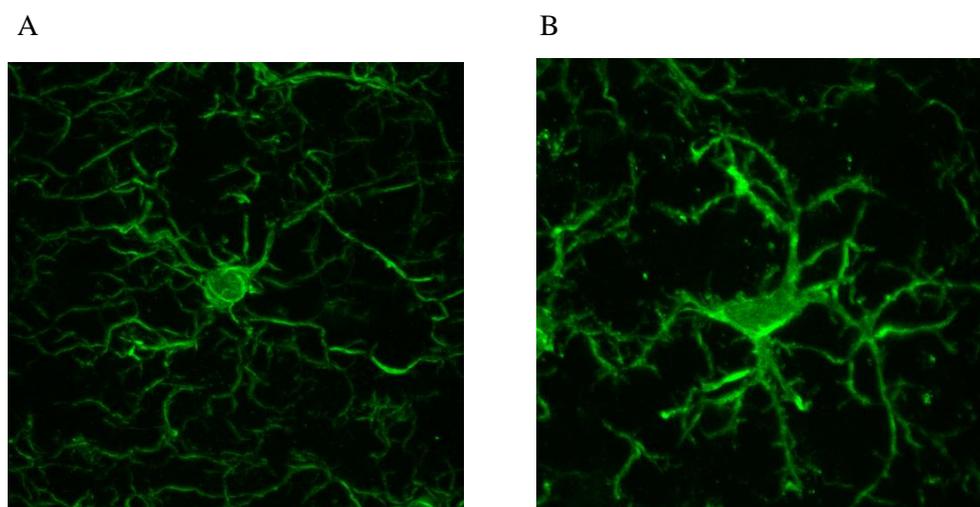


Figura 7.24 – Foto representativa da ativação da micróglia no grupo CLP, por microscopia confocal. Os animais foram submetidos ao CLP de 2 furos. 24 h após, foram sacrificados e perfundidos, para coleta de um hemisfério cerebral, para marcação de ativação de micróglia, usando-se anticorpo IBA-1. Foto tirada em microscópio confocal, com aumento de 157x. A representa o grupo SHAM+Salina e B representa grupo CLP+Salina. Observa-se, em B, micróglia hipertrófica, com aumento do corpo celular e espessamento das ramificações.

7.4) Análises Clínicas do Grupo CLP de 4 Furos

A fim de verificarmos se a tendência de diminuição da mortalidade nos animais CLP tratados com midazolam e morfina se mantinha, independente da gravidade da sepse, realizamos novo experimento de ligadura do ceco e perfuração com 4 furos.

Observamos aumento da sobrevida nos grupos tratados com midazolam e morfina (figura 7.25). A curva de Kaplan-Meier mostrou sobrevida de 100% nos grupos SHAM, com maior mortalidade no grupo CLP+Salina, seguidos pelos grupos CLP+Midazolam e CLP+Morfina. Verificamos significado estatístico pela análise de Log-Rank (Mantel-Cox teste) e pelo pós teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. Na análise entre 2 grupos pareados, a comparação entre a mortalidade do grupo CLP+Salina *vs* CLP+Morfina apresentou resultado significativo, utilizando-se o teste T student.

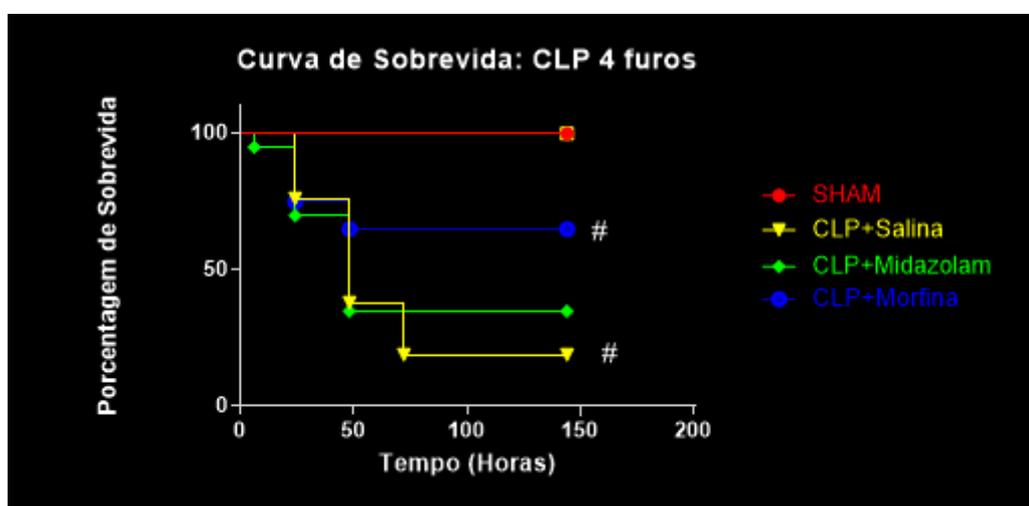


Figura 7.25 - Aumento da sobrevida nos grupos CLP (4 furos) tratados com midazolam ou morfina. Os animais foram submetidos ao CLP de 4 furos e tratados, 5 h após, com midazolam 40mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Anotamos os escores de mortalidade em 6 h, 24h, 48 h, 7-10 dias e 15 dias. Administrado meropenem 30 mg/kg IP 6 h, 24 h e 48 h pós o CLP. N inicial de 8 animais para cada grupo SHAM e 40 animais para cada grupo CLP. A análise estatística das curvas, pelos testes de Gehan-Breslow-Wilcoxon e Log-rank (Mantel-Cox), mostrou significância ($p < 0,05$). Verificamos uma tendência importante de diminuição da mortalidade ao compararmos especificamente os grupos CLP+Salina *versus* CLP+Morfina (marcados com # na curva), com relevância estatística pelo teste T student ($p < 0,05$).

Foram também analisados os escores clínicos de Sepse 24 e 48 h após o CLP de 4 furos (figuras 7.26 e 7.27). Notamos, nos grupos CLP, a presença de alguns animais com sepse grave, tendo sido necessário aumento da dose de antibioticoterapia (meropenem 30 mg/kg IP), devido ao aumento das taxas de mortalidade associadas ao CLP de 4 furos.

Há diminuição dos escores clínicos de sepse nos animais sedados com morfina em comparação ao grupo CLP+Salina, 24 h e 48 h após CLP 4 furos, com significado estatístico, sugerindo um efeito “protetor” da morfina. Por outro lado, o midazolam parece aumentar os escores de sepse 24h e 48 h após CLP 4 furos.

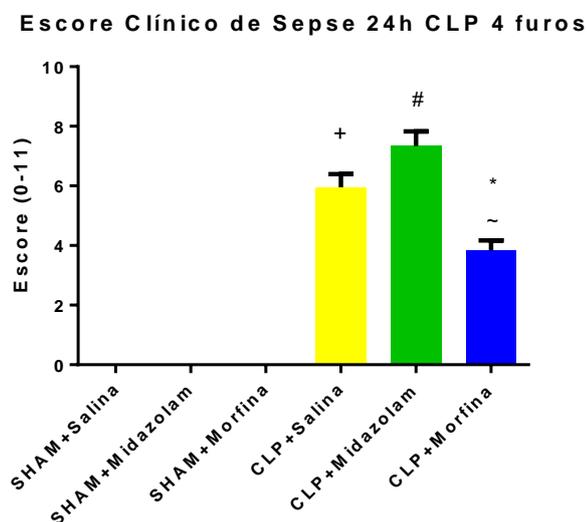


Figura 7.26 – Alterações dos escores clínicos de sepse de 24h nos animais tratados com drogas sedativas pós CLP 4 furos. Animais submetidos ao CLP de 4 furos e tratados, 5 h após, com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Feito antibióticoterapia com 30 mg/kg de meropenem IP. Colhidos os dados clínicos, 24 h após o procedimento cirúrgico. N de 8 animais para cada grupo SHAM e 14, 16 e 17 para cada grupo CLP, respectivamente. Há diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise entre 2 grupos mostrou significado na comparação CLP+Salina vs SHAM+Salina (+), CLP+Salina vs CLP+Morfina(*), CLP+Salina vs CLP+Midazolam (#) e CLP+Midazolam vs CLP+Morfina (~), pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon, com $p < 0,05$.

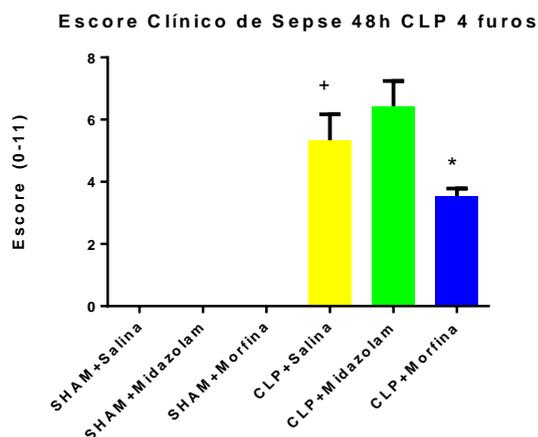


Figura 7.27 – Análise do escore clínico de sepse 48h após CLP 4 furos. Camundongos submetidos ao CLP de 4 furos e tratados, 5 h após, com midazolam 40 mg/Kg IP, morfina 80 mg/Kg IP ou salina 0,5 ml IP. Feito antibióticoterapia com 30 mg/kg de meropenem IP. Colhidos os dados clínicos, 48 h após o procedimento cirúrgico. N aproximado de 8 animais para cada grupo SHAM e 6, 11 e 13 animais para cada grupo CLP, respectivamente (devido às taxas de mortalidade). Observamos alterações dos escores clínicos nos grupos sedados 5 h após o CLP, com significado estatístico pelo teste Kruskal-Wallis. Na comparação entre 2 grupos individualmente, os grupos CLP+Salina vs SHAM+Salina (+) e CLP+Midazolam vs CLP+Morfina (*) apresentaram diferença estatística pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon, ($p < 0,05$).

8.0) Discussão

A sepse é uma doença que constitui um importante problema em saúde pública, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde a incidência é alarmante. Além dos gastos e taxas elevadas de mortalidade, vem sendo associada a danos tardios neurológicos. Muitos dos pacientes sépticos necessitam de sedação e analgesia durante sua internação em unidades de terapia intensiva. Existe a possibilidade destas medicações usadas interagirem tanto com o sistema imune, quanto com o neurológico, modificando desfechos.

As drogas testadas (midazolam e morfina) foram escolhidas devido a associação frequente entre benzodiazepínicos e opióides para sedar pacientes internados em unidades de terapia intensiva (Arnold e cols.,2010). São protótipos comparativos destas classes de medicações, utilizadas tanto em anestesia, como em terapia intensiva.

A administração intraperitoneal, comumente utilizada em animais de laboratório, foi preferida por considerarmos a dificuldade técnica acoplada à venóclise, nos animais de pequeno porte como os camundongos. No entanto, devemos ponderar problemas relacionados a esta via de administração, como, por exemplo, o risco de injeção inadvertida em subcutâneo ou em órgãos intra-abdominais, e a impossibilidade de remoção do agente administrado (Gargiulo e cols., 2012). Pode haver também interferência na absorção, devido à administração de outras medicações pela mesma via ou por possíveis alterações peritoneais inflamatórias induzidas pela sepse.

A dose de midazolam de 40 mg/kg IP já havia sido usada em outros trabalhos, mostrando grau leve de sedação (Inada e cols., 2004). As doses de morfina são variáveis na literatura, sendo doses mais altas, administradas via IP, associadas a algumas alterações antiinflamatórias (Natorska e Plytycz, 2005), por isso, o interesse por tais doses. Além disso, fora o efeito sedativo e depressor cardio-ventilatório, dependendo da dose de morfina, já foi descrito, na literatura, um efeito de aumento de atividade locomotora em murinos chamado de “running fit” (Goldstein e Sheehan, 1969; Gwynn e Domino, 1984; Michaluk e cols., 1991).

Para indução de sepse, foi escolhido o modelo já consolidado de infecção abdominal polimicrobiana que mais se assemelha à sepse abdominal humana: o modelo de ligadura do ceco e perfuração (Dyson e Singer, 2009). Criado em 1980 por Wichterman e cols., são dificuldades inerentes ao modelo depender de uma cirurgia para realização e o fato de o grau de gravidade da sepse variar conforme a quantidade de fezes que cai na cavidade abdominal, o local e tensão da ligadura cecal. Fatos estes altamente relacionados às habilidades do pesquisador que o realiza.

Segundo Benjamin e cols. (2000), conforme a mortalidade da sepse, pode-se classificar o modelo de CLP em subletal ou letal. O modelo de CLP subletal é marcado pelo aumento de neutrófilos na cavidade peritoneal, ao contrário do letal, onde os neutrófilos migram menos, facilitando a ocorrência de infecções secundárias. O modelo de CLP de 2 furos, realizado sempre pelo mesmo pesquisador, para evitar vieses, foi escolhido por ser subletal e devido ao intuito de acompanhar a sobrevivência dos animais, a fim de compararmos diferenças de morbimortalidade nos grupos tratados.

Conforme esperado no modelo de sepse sub-letal, observamos diminuição de mononucleares, com aumento de polimorfonucleares (sobretudo neutrófilos), na contagem diferencial do sangue e do lavado peritoneal dos grupos CLP. O maior aumento de polimorfonucleares no lavado peritoneal dos grupos CLP+Salina e CLP+Midazolam pode estar relacionado a maior quantidade de unidades formadoras de colônia (CFU) nos respectivos grupos, uma vez que nas fases iniciais da sepse costuma haver aumento da migração de polimorfonucleares e neutrófilos para o local da infecção (Fialkow e cols., 2006).

O CLP de 2 furos induziu sepse moderada (escore clínico 4-7) na maioria dos animais, sendo a mortalidade mais alta naqueles que apresentaram sepse grave, mesmo com o tratamento antibiótico (em torno de 40-50%). Todos os animais SHAM sobreviveram.

Dado interessante foi o aumento da sobrevivência observado nos animais tratados com morfina. Este mesmo padrão da curva de Kaplan-Meier se repetiu com o modelo de CLP de 4 furos, associado a maior mortalidade e gravidade da sepse, sendo inclusive necessárias maiores doses de antibioticoterapia neste grupo (meropenem 30 mg/kg IP 6 h, 24 h e 48 h pós CLP). O tratamento com midazolam e morfina diminuiu a mortalidade, em relação ao CLP+Salina, sendo esta diminuição mais significativa para os animais CLP+Morfina, com significado estatístico. Observamos, também, no CLP de 4 furos, diminuição do escore de 24h e 48 h nos animais CLP+Morfina (com $p < 0,05$), sugerindo melhora dos parâmetros clínicos e efeito “protetor” da morfina, quando administrada na fase inicial da sepse.

Já o midazolam, apesar da discreta diminuição da mortalidade associada, tendeu a aumentar os escores clínicos em 24 e 48 h. Uma hipótese seria a possibilidade de alguma sedação residual associada ao comprometimento da função hepática pela sepse, levando a alterações dos escores clínicos; já que os animais sedados com midazolam apresentaram maiores escores de sedação e a droga depende de metabolismo hepático e renal. Fatos que corroboram para esta hipótese foram as tendências de aumento dos valores de creatinina, AST e ALT no grupo CLP+Midazolam, bem como a diminuição da albumina sérica, que poderiam sugerir início de um comprometimento das funções hepática e renal.

Alguns estudos que mostraram melhora de sobrevida em modelos de sepse, com uso de drogas sedativas e anestésicas, associaram esta melhora a alterações na produção de citocinas inflamatórias. Hermann e cols. (2013), mostraram aumento da sobrevida de camundongos submetidos ao CLP de 4 furos, seguido de condicionamento com desflurano ou sevoflurano (anestésicos gerais inalatórios) durante 2 h. Os anestésicos voláteis atenuaram marcadores de injúria tecidual (bioquímica) e mediadores inflamatórios como MCP-1 e IL-6 (citocinas essenciais na fase de hiperinflamação da sepse).

Em 2009, Quiao e cols. demonstraram melhora de desfechos em ratos submetidos ao CLP de 2 furos e sedados com midazolam ou dexmedetomidina via intravenosa por 8h. Foram colhidas citocinas inflamatórias TNF α e IL-6, até 6 h após o procedimento de CLP, e acompanhadas as taxas de mortalidade por 24 h. Os autores observaram redução da mortalidade nos animais sedados; diminuição dos níveis de TNF α em ambos os grupos, diminuição de IL-6 nos animais sedados com dexmedetomidina e redução da expressão de caspase-3 ativada esplênica (marcador de apoptose).

Os benzodiazepínicos parecem suprimir a produção de mediadores pró-inflamatórios, expressão de COX-2 e iNOS, em modelos de sepse, de maneira dose-dependente. Sugere-se que o mecanismo seja mediado pela inibição da translocação nuclear do fator nuclear kappa B, reduzindo a fosforilação da proteína mitogênica ativada p38 e estabilizando mastócitos (MacLaren, 2009).

Os resultados de estudos animais mostram desfechos conflitantes em relação aos benzodiazepínicos, em contraste com a dexmedetomidina. Tsao e cols., por exemplo, não encontraram benefícios relacionados ao uso de midazolam IV em ratos com endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo. Não observaram melhora hemodinâmica, de mortalidade, nem de marcadores de disfunção orgânica, como indicadores de funções hepática e renal, nos grupos tratados (Tsao e cols., 2009).

Poucos estudos investigaram os efeitos imunomoduladores de sedativos em pacientes críticos. Em pacientes cirúrgicos, midazolam na dose de 0,02 – 0,06 mg/kg/h reduziu a produção de TNF α , IL-1 β e IFN- γ em 48 h de pós-operatório; enquanto Propofol 0,5-1,5 mg/kg/h aumentou a produção destas citocinas (Helmy e Al-Attiyah, 2001). Uma comparação entre dexmedetomidina 0,2-2,5 μ g/kg/h e midazolam 0,1-1,5 mg/kg/h, em pacientes sépticos, mostrou que apenas dexmedetomidina suprimiu a produção de IL-1 β , TNF α e IL-6. No entanto, ambos agentes melhoraram a oxigenação, medida através do pH da mucosa gástrica. Em estudos experimentais animais, o pH da mucosa gástrica diminui, na medida que a perfusão esplênica e o transporte de oxigênio caem a níveis incapazes de sustentar a produção de energia pelo metabolismo aeróbico. A acidose intramucosa tem sido associada a pior prognóstico e

disfunção orgânica múltipla em pacientes críticos, mesmo na ausência de hipotensão ou acidose metabólica sistêmica (Memis e cols., 2007).

Nosso estudo, em consonância com os demais citados, mostrou apenas discreta tendência de melhora da mortalidade nos grupos tratados com midazolam, além da tendência de diminuição das citocinas MCP-1, IL-1 β , IL-6 no lavado peritoneal desses animais. No sangue houve diminuição de MCP-1 e IL-1 β .

Os efeitos da morfina sobre o sistema imune ainda são controversos. Existe a possibilidade dos diferentes tipos de receptores opióides serem responsáveis por seus efeitos anti ou pró-inflamatórios (Finley e cols., 2008). Os opióides exercem seus efeitos via receptores periféricos e centrais, presentes em células nervosas (como as células da glia) e do sistema imune, ou via sistema nervoso autonômico e central. (Lisowska e cols., 2013).

Os opióides parecem regular o sistema imune em modelos animais afetando os braços da imunidade inata e adquirida. A atividade das células Natural Killer (NK), a proliferação das células T, produção de anticorpos e de citocinas, função de fagocitose podem ser afetadas. Muitos destes efeitos são revertidos por antagonistas opióides. Já foi aventada a associação entre opióides e a indução de sepse em modelos animais laboratoriais. Existe a possibilidade do aumento de risco de infecções em alguns pacientes (Odunayo e cols., 2010).

Roy e cols., mostraram, em 1999, que baixas doses de morfina (4 mg/kg) aumentaram a resposta ao estímulo com LPS em modelo animal de endotoxemia. Houve aumento da mortalidade em 48 h, diminuição da celularidade tímica, diminuição da síntese de IL-2 de maneira mais precoce e aumento da produção de citocinas de perfil Th2.

Em 2011, Breslow e cols. desenharam um experimento de infecção intraperitoneal por *Acinetobacter baumannii* em camundongos. A morfina, administrada durante 48 h por meio de “pellets” de liberação lenta, implantados no subcutâneo, aumentou a mortalidade, comparada com placebo, efeito revertido pelo antagonista de receptor μ opióide, naltrexona. A concentração de *Acinetobacter* (CFU) em amostras do sangue, baço, fígado e pulmões foi maior nos animais tratados com morfina. Verificou-se também aumento das citocinas inflamatórias neste grupo (foram analisadas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN γ , TNF α e IL-12 no plasma, cerca de 8 h após o estímulo). A morfina levou a redução do número total de células da cavidade peritoneal, diminuição da percentagem e número total de neutrófilos e diminuição do número total de macrófagos.

Em 2012, Babrowski e cols., mostraram, em modelo experimental com camundongos, que o implante subcutâneo de “pellet” de morfina aumentou a virulência de *Pseudomonas aeruginosa* injetada via cecal e sua capacidade de aumento da letalidade em indivíduos sépticos suscetíveis.

Foi demonstrado que altas doses de morfina IP apresentam efeitos antiinflamatórios em algumas cepas de camundongos. Nos camundongos CBA, ocorre diminuição de polimorfonucleares no peritônio. A pré-incubação de leucócitos de camundongos suíços com morfina inibiu quimiotaxia. Os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos da morfina foram revertidos pelo pré-tratamento com naltrexone (Natorska e Plytycz, 2005).

Ao contrário dos estudos citados, porém de acordo com Natoska e Plytycz, observamos em nosso desenho experimental melhora dos parâmetros inflamatórios, na morbidade e aumento da sobrevivência no grupo tratado com morfina. Identificamos, como já mencionado nos resultados, melhora dos escores clínicos de sepse, diminuição da mortalidade na curva de Kaplan-Meier (os animais foram acompanhados durante 8-15 dias).

As citocinas inflamatórias IL-1 β , MCP-1, IL-6 apresentam-se aumentadas no LP durante a sepse. Esses resultados vão ao encontro do aumento inicial das citocinas pró-inflamatórias na sepse sub-letal (Gomes e cols., 2006). Observamos, porém uma tendência de diminuição destas citocinas no plasma e lavado peritoneal dos animais tratados com morfina; assim como, aumento da citocina IL-10, no sangue destes animais.

Acredita-se que a sepse apresente uma fase inicial pró-inflamatória, caracterizada pelo envolvimento de linfócitos, neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, aumento de citocinas pró-inflamatórias, aumento de ROS, participação dos sistemas de complemento e de coagulação; seguida por uma fase anti-inflamatória, com aumento das citocinas anti-inflamatórias, apoptose de linfócitos, dano tecidual e imunossupressão (Doi e cols., 2009).

Ashare e col., em 2005, sugeriram que o tempo e a magnitude da resposta anti-inflamatória eram importantes fatores para prever a gravidade da infecção em modelos murinos de CLP. Os autores demonstraram predomínio de citocinas inflamatórias (como IL-1 β , TNF α) nas 6 h após CLP e predomínio anti-inflamatório nas 24 h seguintes. Neste experimento, o uso de antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) antes do CLP, para modular a resposta anti-inflamatória, resultou em diminuição de citocinas pró-inflamatórias, diminuição da eliminação bacteriana e aumento de mortalidade. Dessa forma, o balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias se correlaciona diretamente com a gravidade da infecção e a mortalidade.

Uma hipótese para explicar nossos achados diferentes de outros artigos, sobretudo em relação à morfina, seria o fato de termos administrado os sedativos 5 h após o CLP, justamente na fase de predomínio de citocinas pró-inflamatórias. Ou seja, administramos drogas de perfil anti-inflamatório na fase da sepse de predomínio pró-inflamatório. Ao contrário, os outros modelos experimentais citados administravam opióides no momento ou imediatamente antes da infecção, o que poderia prejudicar a resposta pró-inflamatória inicial, bem como o equilíbrio das fases pró e anti-inflamatórias, levando a aumento de citocinas e da mortalidade precoce.

O sistema imune periférico é capaz de conectar-se com o sistema nervoso central (SNC), diante de uma infecção. Citocinas podem atingir o SNC, via vagal por exemplo, e estimular receptores específicos (Ek e cols., 1998). A informação transmitida estimula o cérebro a produzir o mesmo padrão de citocinas pró-inflamatórias que a periferia (Dantzer, 2004). Astrócitos e micróglia são considerados as principais fontes de citocinas no cérebro, responsáveis pela mediação da resposta imune e inflamatória cerebrais (Amor e cols., 2010).

Conforme outros estudos de dosagens de citocinas cerebrais (Erickson e Banks, 2011), confirmamos essa mesma tendência anti-inflamatória periférica encontrada sobre o Sistema Nervoso Central dos grupos CLP tratados com midazolam e morfina. Houve diminuição significativa dos níveis de IL-6 e MCP-1 no córtex de 24 h destes animais, com significado estatístico.

Micróglia são células do sistema nervoso central ativadas pela presença de insulto tissular, capazes de produzir citocinas e quimiocinas, a fim de remover toxinas do espaço extracelular. Essa ativação pode levar à ruptura da barreira hematoencefálica, produção de espécies reativas de oxigênio, associadas ao dano cerebral na encefalopatia séptica (Michels e cols., 2014). Dessa forma, é compatível nosso achado de ativação da micróglia no grupo CLP em comparação ao Sham.

PSD 95 é uma proteína de densidade pós-sináptica que desempenha importante papel na neuroplasticidade neuronal (Bustos e cols., 2014), estando relacionada a receptores excitatórios do sistema nervoso central, como NMDA. Chugh e cols. (2013) demonstraram associação entre aumento da densidade pós-sináptica de PSD95 e aumento da conectividade excitatória sináptica nos neurônios, nos estágios iniciais de sinaptogênese. Por outro lado, um decréscimo de PSD95 correlaciona-se ao decréscimo da transmissão excitatória. Lai e cols. em 2014, mostraram que a excitotoxicidade, mediada pelo glutamato, pode estar relacionada à isquemia e morte neuronal.

Apesar de não termos encontrado estudos da associação direta entre os níveis de PSD95 na sepse, supomos que a diminuição encontrada nos grupos CLP pode tratar-se de um mecanismo compensatório. Talvez a inflamação esteja associada ao decréscimo da transmissão excitatória, junto à diminuição da densidade pós-sináptica de PSD95. Na medida em que o tratamento com drogas de perfis anti-inflamatórios (como midazolam e morfina) diminui a inflamação, poderia haver incremento da atividade excitatória, com tendência de aumento dos níveis de PSD95.

Da mesma forma, a PSD95 pode estar associada a alterações neurológicas e danos cognitivos na sepse; já que Moore e cols, em 2014, mostraram que a desregulação do acoplamento de PSD95 com canais KV1 poderia estar associada ao comprometimento da

vasodilatação e fluxo sanguíneo cerebral (a proteína PSD95 está associada também a canais de voltagem KV1 na musculatura lisa cerebral).

Encontramos, portanto, em nosso trabalho, benefícios anti-inflamatórios do uso de sedativos (morfina e midazolam) durante a fase inicial da sepse, os quais, possivelmente, seriam responsáveis pela diminuição de mortalidade precoce observada nos modelos de CLP de 2 e 4 furos (mais expressiva no grupo CLP+Morfina). Logicamente, ainda faltam pesquisas para que isso seja translacionado para a clínica. No entanto, frisamos a importância do estudo e da comparação entre diferentes drogas sedativas e analgésicas, comumente usadas em pacientes críticos, capazes de interferir nos sistemas imune e neurológico, alterando desfechos. Conforme McLaren afirmou em 2009, pode ser que, um dia, a escolha de sedativos usados em pacientes sépticos se baseia não apenas nas propriedades farmacocinéticas e sedativas da droga, mas também em seu perfil imuno-sedativo.

9.0) Conclusão

Tentamos reproduzir com o modelo experimental o quadro de um paciente séptico que necessita de drogas sedativas e/ou analgésicas em unidade de terapia intensiva. Para tal, utilizamos o modelo de Ligadura do Ceco e Perfuração, sendo administradas as mesmas drogas usadas no contexto hospitalar.

Observamos redução da mortalidade (sobretudo precoce) e melhora dos escores clínicos, nos grupos CLP tratados com morfina, nas primeiras 5 horas da doença. Essa melhora foi significativa nos animais submetidos ao CLP de 4 furos. Houve tendência de redução das citocinas e quimiocinas inflamatórias de 24 h do lavado peritoneal (IL-6, MCP-1, IL-1 β) e do sangue (MCP-1 e IL-1 β), nos grupos tratados com midazolam e morfina. Em paralelo, houve redução de IL-6 e MCP-1, nas dosagens de citocinas dos respectivos grupos, por ELISA do córtex cerebral. Essa redução foi relevante estatisticamente, ao compararmos a dosagem de IL-6 cerebral dos grupos CLP+Salina *versus* CLP+Midazolam e CLP+Salina *versus* CLP+Morfina; bem como, a dosagem de MCP-1 cerebral dos grupos CLP+Salina *versus* CLP+Midazolam. Observou-se também aumento de PSD95 (proteína associada à excitabilidade e neuroplasticidade neuronal), nos grupos CLP tratados. Tais resultados apontariam para um possível efeito benéfico do uso precoce destas drogas, em pacientes sépticos, inclusive no sentido de prevenir danos cognitivos tardios.

No entanto, ainda faltam estudos para que se possa translacionar estes dados para a prática clínica.

10.0) Referências Bibliográficas

- Amor S, Puentes F, Barker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 2010;129:154-169.
- 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.
- Araújo CV, Estado V, Tibiriça E, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Silva AR. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvascular Research* 2012 Sep;84(2):218-21.
- Arnold HM, Hollands JM, Skrupky LP, Mice ST. Optimizing sustained use of sedation in mechanically ventilated patients: focus on safety. *Current Drug Safety* 2010. 5:6-12.
- Ashare A, Powers LS, Butler NS, Doerschug KC, Monick MM, Hunninghake GW. Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Apr;288(4):L633-40.
- Babcock GF, Hernandez L, Yadav E, Schwemberger S, Dugan A. The burn wound inflammatory response is influenced by midazolam. *Inflammation*. 2012 Feb;35(1):259-70.
- Babrowski T, Holbrook C, Moss J, Gottlieb L, Valuckaite V, Zaborin A, Poroyko V, Liu DC, Zaborina O, Alverdy JC. *Pseudomonas aeruginosa* virulence expression is directly activated by morphine and is capable of causing lethal gut-derived sepsis in mice during chronic morphine administration. *Ann Surg*. 2012 Feb;255(2):386-93.
- Barr J, Donner A. Optimal intravenous dosing strategies for sedatives and analgesics in the intensive care unit. *Crit Care Clin*. 1995 Oct;11(4):827-47.
- Barr J, Zomorodi K, Bertaccini EJ, Shafer SL, Geller E. A double-blind, randomized comparison of i.v. lorazepam versus midazolam for sedation of ICU patients via a pharmacologic model. *Anesthesiology*. 2001 Aug;95(2):286-98.
- Barr J, Fraser GL, Puntillo K, Ely EW, Gélinas C, Dasta JF, Davidson JE, Devlin JW, Kress JP, Joffe AM, Coursin DB, Herr DL, Tung A, Robinson BR, Fontaine DK, Ramsay MA, Riker RR, Sessler CN, Pun B, Skrobik Y, Jaeschke R. Clinical practice guidelines for the management of pain, agitation, and delirium in adult patients in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 2013 Jan;41(1):263-306.

- Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, Dobb G, Levy M, Martin G, Martin C, Ramsey G, Silva E, Vallet B, Vincent JL, Janes JM, Sarwat S, Williams MD; PROGRESS Advisory Board. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. *Infection*. 2009 Jun;37(3):222-32.
- Benjamin CF, SH Ferreira, FQ Cunha. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis* 2000.182:214-23.
- Boast CA, Pastor G, Gerhardt SC, Hall NR, Liebman JM. Behavioral tolerance and sensitization to CGS19755, a competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988 Nov;247(2):556-61.
- Boland JW, McWilliams K, Ahmedzai SH, Pockley AG. Effects of opioids on immunologic parameters that are relevant to anti-tumour immune potential in patients with cancer: a systematic literature review. *Br J Cancer*. 2014 Jul 15.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine *Chest*.1992. *Chest*. 2009 Nov;136(5 Suppl):e28 .
- Bonnet MP, Beloeil H, Benhamou D, Mazoit JX, Asehnoune K. The mu opioid receptor mediates morphine-induced tumor necrosis factor and interleukin-6 inhibition in toll-like receptor 2-stimulated monocytes. *Anesth Analg*. 2008 Apr;106(4):1142-9.
- Breslow JM, Monroy MA, Daly JM, Meissler JJ, Gaughan J, Adler MW, Eisenstein TK. Morphine, but not trauma, sensitizes to systemic *Acinetobacter baumannii* infection. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2011 Dec;6(4):551-65.
- Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animals models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Oct;4(10):854-65.
- Bustos FJ, Varela-Nallar L, Campos M, Henriquez B, Phillips M, Opazo C, Aguayo LG, Montecino M, Constantine-Paton M, Inestrosa NC, van Zundert B. PSD95 suppresses dendritic arbor development in mature hippocampal neurons by occluding the clustering of NR2B-NMDA receptors. *PLoS One*. 2014 Apr 4;9(4):e94037.
- Cesarovic N, Jirkof P, Rettich A, Nicholls F, Arras M. Combining sevoflurane anesthesia with fentanyl-midazolam or s-ketamine in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012 Mar;51(2):209-18.
- Chang H, Tsai SY, Chang Y, Chen TL, Chen RM. Therapeutic concentrations of propofol protects mouse macrophages from nitric oxide-induced cell death and apoptosis. *Can J Anaesth*. 2002 May;49(5):477-80.

- Chen RM, Wu CH, Chang HC, Wu GJ, Lin YL, Sheu JR, Chen TL. Propofol suppresses macrophage functions and modulates mitochondrial membrane potential and cellular adenosine triphosphate synthesis. *Anesthesiology* 2003;98:1178–85.
- Chugh DA, Nilson P, Afjei SA, Bakochi A, Ekdahl CT. Brain inflammation induces post-synaptic changes during early synapse formation in adult-born hippocampal neurons. *Experimental Neurology*. 2013 Dec;250:176–188.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):885-91.
- Cunha MGAT. Atividade protetora da enzima PAF-acetilhidrolase (PAF-AH) na sepse: Efeitos sobre a eliminação bacteriana. Rio de Janeiro. Tese [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz; 2010.
- Curi R, Homem de Bittencourt Júnior PI. Metabolismo do ácido aracdônico. In: Silva FP, Velasco IT, editores. *Sepse*. Barueri:Manole;2007.p.214-42.
- Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct 1;500(1-3):399-411.
- Dyson A, and Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting?. *Crit Care Med*. 2009 Jan;37(1 Suppl):S30-7.
- Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, and Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. 2009 Oct;119(10):2868-78.
- Echtenacher B, Urbaschek R, Weigl K, Freudenberg MA, and Männel DN. Treatment of experimental sepsis-induced immunoparalysis with TNF. *Immunobiology*. 2003;208(4):381-9.
- Ek M, Kurosawa M, Lundeberg T, and Ericsson A. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci*. 1998 Nov 15;18(22):9471-9.
- Erickson MA, and Banks WA. Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis. *Brain Behav Immun*. 2011 Nov;25(8):1637-48.
- Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozzetti MC, Milani AR, Rodrigues Filho EM, Ladniuk RM, Pierozan P, de Moura RM, Prolla JC, Vachon E, and Downey GP. Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2006;10(6):R155.
- Finley MJ, Happel CM, Kaminsky DE, and Rogers TJ. Opioid and nociceptin receptors regulate cytokine and cytokine receptor expression. *Cell Immunol*. 2008 Mar-Apr;252(1-2):146-54.

- Flohé SB, Agrawal H, Schmitz D, Gertz M, Flohé S, and Schade FU. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol.* 2006 Mar;79(3):473-81.
- Fong JJ, Kanji S, Dasta JF, et al. Propofol associated with shorter duration of mechanical ventilation than scheduled intermittent lorazepam: A database analysis using Project IMPACT. *Ann Pharmacother* 2007;41:1986-91.
- Franchi S, Moretti S, Castelli M, Lattuada D, Scavullo C, Panerai AE, Sacerdote P. Mu opioid receptor activation modulates Toll like receptor 4 in murine macrophages. *Brain Behav Immun.* 2012 Mar;26(3):480-8.
- Galley HF, Dubbels AM, Webster NR. The effect of midazolam and propofol on interleukin-8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Anesth Analg.* 1998 Jun;86(6):1289-93.
- Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A, Vesce GM. Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR J* 2012;53(1):E55-69.
- Girard TD, Pandharipande PP, Carson SS, et al. Feasibility, efficacy, and safety of antipsychotics for intensive care unit delirium: The MIND randomized, placebo-controlled trial. *Crit Care Med* 2010; 38:428–437.
- Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):176-80.
- Goldstein A, Sheehan P. Tolerance to opioid narcotics. I. Tolerance to the "running fit" caused by levorphanol in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 1969 Oct;169(2):175-84.
- Gomes RN, Figueiredo RT, Bozza FA, Pacheco P, Amâncio RT, Laranjeira AP, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Bozza MT. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock.* 2006 Nov;26(5):457-63.
- Guirgis FW, Khadpe JD, Kuntz GM, Wears RL, Kalynych CJ, Jones AE. Persistent organ dysfunction after severe sepsis: a systematic review. *J Crit Care.* 2014 Jun;29(3):320-6.
- Gwynn GJ, Domino EF. Genotype-dependent behavioral sensitivity to mu vs. kappa opiate agonists. I. Acute and chronic effects on mouse locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984 Nov;231(2):306-11.
- Hall RI, Sandham D, Cardinal P, et al. Study investigators: Propofol vs Midazolam for ICU sedation: a canadian multicenter randomized trial. *Chest* 2001;119:1151-59.

- Helmy SA, Al-Attiyah RJ. The immunomodulatory effects of prolonged intravenous infusion of propofol versus midazolam in critically ill surgical patients. *Anaesthesia*. 2001 Jan;56(1):4-8.
- Hernandes MS, D'Avila JC, Trevelin SC, Reis PA, Kinjo ER, Lopes LR, Castro-Faria-Neto HC, Cunha FQ, Britto LR, Bozza FA. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. *J Neuroinflammation*. 2014 Feb 27;11:36.
- Herrmann IK, Castellon M, Schwartz DE, Hasler M, Urner M, Hu G, Minshall RD, Beck-Schimmer B. Volatile anesthetics improve survival after cecal ligation and puncture. *Anesthesiology*. 2013 Oct;119(4):901-6.
- Hla T, Ristimäki A, Appleby S, JG. Cyclooxygenase gene expression in inflammation and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Nov 30;696:197-204.
- Hofer S, Steppan J, Wagner T, et al. Central sympatholytics prolong survival in experimental sepsis. *Crit Care*. 2009;13(1):R11.
- Hogan BV, Peter MB, Shenoy HG, Horgan K, and Hughes TA. Surgery induced immunosuppression. *Surgeon*. 2011 Feb;9(1):38-43.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE Jr, Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*. 2001 Jun 1;166(11):6952-63.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003 Jan 9;348(2):138-50.
- Hutchinson MR, Zhang Y, Shridhar M, Evans JH, Buchanan MM, Zhao TX, Slivka PF, Coats BD, Rezvani N, Wieseler J, Hughes TS, Landgraf KE, Chan S, Fong S, Phipps S, Falke JJ, Leinwand LA, Maier SF, Yin H, Rice KC, Watkins LR. Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav Immun*. 2010 Jan;24(1):83-95.
- Inada T, Taniuchi S, Shingu K, et al. Propofol depressed neutrophil hydrogen peroxide production more than midazolam, whereas adhesion molecule expression was minimally affected by both anesthetics in rats with abdominal sepsis. *Anesth Analg* 2001;92(2):437-41.
- Inada T, Asai T, Yamada M, Shingu K. Propofol and midazolam inhibit gastric emptying and gastrointestinal transit in mice. *Anesth Analg*. 2004 Oct;99(4):1102-6.
- Istaphanous GK, Howard J, Nan X, Hughes EA, McCann JC, McAuliffe JJ, Danzer SC, Loepke AW. Comparison of neuroapoptotic properties of equipotent anesthetic concentrations of desflurane, isoflurane, or sevoflurane in neonatal mice. *Anesthesiology*. 2011 Mar;114(3):578-87.

- Japiassú AM. Resposta inflamatória e disfunção mitocondrial em pacientes com choque séptico. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz; 2009.
- Kim SN, Son SC, Lee SM, Kim CS, Yoo DG, Lee SK, Hur GM, Park JB, Jeon BH. Midazolam inhibits proinflammatory mediators in the lipopolysaccharide-activated macrophage. *Anesthesiology*. 2006 Jul;105(1):105-10.
- Kelbel I, Koch T, Weber A, et al. Alterations of bacterial clearance induced by propofol. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999;43(1):71–6.
- Kelbel I, Weiss M. Anaesthetics and immune function. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2001 Dec;14(6):685-91.
- Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci*. 2002 Mar;25(3):154-9.
- Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 2014 Apr;115:157-88.
- Lenczowski MJ, Bluthé RM, Roth J, Rees GS, Rushforth DA, van Dam AM, Tilders FJ, Dantzer R, Rothwell NJ, Luheshi GN. Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276(3 Pt 2):R652-8.
- Lewis SS, Hutchinson MR, Rezvani N, Loram LC, Zhang Y, Maier SF, Rice KC, Watkins LR. Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. *Neuroscience*. 2010 Jan 20;165(2):569-83.
- Lisowska B, Szymańska M, Nowacka E, Olszewska M. Anesthesiology and the cytokine network. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013 Aug 5;67:761-9.
- Lobo SM, FRM Lobo. Markers and mediators of inflammatory response in infection and sepsis. *Ver Bras Ter Intensiva*. 2007 19:210-215.
- Loepke AW, Soriano SG. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. *Anesth Analg*. 2008 Jun;106(6):1681-707.
- López-Aguirre Y, Páramo JA. Endothelial cell and hemostatic activation in relation to cytokines in patients with sepsis. *Thromb Res*. 1999 Apr 15;94(2):95-101.
- Makimura C, Arao T, Matsuoka H, Takeda M, Kiyota H, Tsurutani J, Fujita Y, Matsumoto K, Kimura H, Otsuka M, Koyama A, Imamura CK, Yamanaka T, Tanaka K, Nishio K, Nakagawa K. Prospective study evaluating the plasma concentrations of twenty-six cytokines and response to morphine treatment in cancer patients. *Anticancer Res*. 2011 Dec;31(12):4561-8.

- MacLaren R. Immunosedation: a consideration for sepsis. *Crit Care*. 2009;13(5):191.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546-1554.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014 Mar 3;6:13.
- Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014 Jan 1;5(1):4-11.
- McCusker RH, Kelley KW. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. *J Exp Biol*. 2013 Jan 1;216(Pt 1):84-98.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001 Nov;1(2):135-45.
- Memiş D, Hekimoğlu S, Vatan I, Yandım T, Yüksel M, Süt N. Effects of midazolam and dexmedetomidine on inflammatory responses and gastric intramucosal pH to sepsis, in critically ill patients. *Br J Anaesth*. 2007 Apr;98(4):550-2.
- Michaluk J, Antkiewicz-Michaluk L, Rokosz-Pelc A, Vetulani J. Opiate and alpha 1-adrenergic receptors in mice responding to morphine with sedation or with running fit. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1991 Mar-Apr;43(2):115-9.
- Michels M, Danielski LG, Dal-Pizzol F, Petronilho F. Neuroinflammation: Microglial Activation During Sepsis. *Curr Neurovasc Res*. 2014 May 20.
- Mojadadi S, Jamali A, Khansarinejad B, et al. Acute morphine administration reduces cell-mediated immunity and induces reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in BALB/c mice. *Cell Mol Immunol*. 2009 Apr;6(2):111-6.
- Moore CL, Nelson PL, Parelkar NK, Rusch NJ, Rhee SW. Protein kinase A-phosphorylated KV1 channels in PSD95 signaling complex contribute to the resting membrane potential and diameter of cerebral arteries. *Circ Res*. 2014 Apr 11;114(8):1258-67.
- Natorska J, Plytycz B. Strain-specific differences in modulatory effects of morphine on peritoneal inflammation in mice. *Folia Biol (Krakow)*. 2005;53(3-4):189-95.
- Odunayo A, Dodam JR, Kerl ME, DeClue AE. Immunomodulatory effects of opioids. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2010 Aug;20(4):376-85.
- Ohta N, Ohashi Y, Takayama C, et al. Midazolam suppresses maturation of murine dendritic cells and priming of lipopolysaccharide-induced t helper 1-type immune response. *Anesthesiology*. 2011 Feb;114(2):355-62.
- Qiao H, Sanders RD, Ma D, Wu X, Maze M. Sedation improves early outcome in severely septic Sprague Dawley rats. *Crit Care*. 2009;13(4):R136.

- Quílez ME, López-Aguilar J, Blanch L. Organ crosstalk during acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, and mechanical ventilation. *Curr Opin Crit Care*. 2012 Feb;18(1):23-8.
- Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock*. 2005 Dec;24 Suppl 1:7-11.
- Riekerk B, Pen EJ, Hofhuis JG, et al: Limitations and practicalities of CAM-ICU implementation, a delirium scoring system, in a Dutch intensive care unit. *Intensive Crit Care Nurs* 2009; 25:242–249.
- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 2009;4(1):31-6.
- Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*. 2001a. 414(6866):920-4.
- Roger T, Glauser MP, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *J Endotoxin Res*. 2001b;7(6):456-60.
- Roquilly A, Josien R, Asehnoune K. Midazolam impairs immune functions: it's time to take care of dendritic cells. *Anesthesiology*. 2011 Feb;114(2):237-8.
- Roy S, Charboneau RG, Barke RA. Morphine synergizes with lipopolysaccharide in a chronic endotoxemia model. *J Neuroimmunol*. 1999 Mar 1;95(1-2):107-14.
- Roy S, Balasubramanian S, Sumandeeep S, Charboneau R, Wang J, Melnyk D, Beilman GJ, Vatassery R, Barke RA. Morphine directs T cells toward T(H2) differentiation. *Surgery*. 2001 Aug;130(2):304-9.
- Roy S, Ninkovic J, Banerjee S, Charboneau RG, Das S, Dutta R, Kirchner VA, Koodie L, Ma J, Meng J, Barke RA. Opioid drug abuse and modulation of immune function: consequences in the susceptibility to opportunistic infections. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2011 Dec;6(4):442-65.
- Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, et al. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. *Ver Bras Ter Intensiva*. 2006;18(1):9-17.
- 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 (BASES study). *Crit Care*. 2004 Aug;8(4):R251-60.
- Schorr CA, Dellinger RP. The Surviving Sepsis Campaign: past, present and future. *Trends Mol Med*. 2014 Apr;20(4):192-4.

- Shehabi Y, Riker RR, Bokesch PM, et al; SEDCOM (Safety and Efficacy of Dexmedetomidine Compared With Midazolam) Study Group: Delirium duration and mortality in lightly sedated, mechanically ventilated intensive care patients. *Crit Care Med* 2010; 38:2311–2318.
- Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, Tura BR, Silva CL, Cal RG, Beer I, Michels V, Safi J, Kayath M, Silva E; Costs Study Group - Latin American Sepsis Institute. COSTS – A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(5):425-34.
- Stevenson GW, Hall SC, Steven Rudnick BA, et al. The effect of anesthetic agents on human immune response. *Anesthesiology*. 1990;72:542-52.
- Tanaka T, Kai S, Matsuyama T, Adachi T, Fukuda K, Hirota K. General anesthetics inhibit LPS-induced IL-1 β expression in glial cells. *PLoS One*. 2013 Dec 11;8(12):e82930.
- Taniguchi T, Kidani Y, Kanakura H, et al. Effects of dexmedetomidine on mortality rate and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats. *Crit Care Med*. 2004 Jun;32(6):1322-6.
- Tanios MA, de Wit M, Epstein SK, Devlin JW. Perceived barriers to the use of sedation protocols and daily sedation interruption: a multidisciplinary survey. *J Crit Care*. 2009 Mar;24(1):66-73.
- Taupin V, Jayais P, Descamps-Latscha B, Cazalaa JB, Barrier G, Bach JF, Zavala F. Benzodiazepine anesthesia in humans modulates the interleukin-1-beta, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 responses of blood monocytes. *J Neuroimmunol*. 1991 Dec;35(1-3):13-9.
- Tsao CM, Wu CC, Liaw WJ, Ho ST. Effects of midazolam on organ dysfunction in rats with endotoxemia induced by lipopolysaccharide. *Acta Anaesthesiol Taiwan*. 2009 Mar;47(1):10-6.
- Vanhorebeek I, Van den Berghe G .2006 The neuroendocrine response to critical illness is a dynamic process. *Crit Care Clin* 22:1-15.
- Vermont CL, Hazelzet JA, de Kleijn ED, van den Dobbelen GP, de Groot R. CC and CXC chemokine levels in children with meningococcal sepsis accurately predict mortality and disease severity. *Crit Care*. 2006 Feb;10(1):R33.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 22:707-710.
- von Dossow V, Luetz A, Haas A, Sawitzki B, Wernecke KD, Volk HD, Spies CD. Effects of remifentanyl and fentanyl on the cell-mediated immune response in patients undergoing elective coronary artery bypass graft surgery. *J Int Med Res*. 2008 Nov-Dec;36(6):1235-47.

- Weatherby KE, Zwilling BS, Lafuse WP. Resistance of macrophages to *Mycobacterium avium* is induced by alpha2-adrenergic stimulation. *Infect Immun* 2003;71:22–9.
- Wei M, Li L, Meng R, et al. Suppressive effect of diazepam on IFN-gamma production by human T cells. *Int Immunopharmacol*. 2010 Mar;10(3):267-71.
- Weinbroum AA, Halpern P, Rudick V, Sorkine P, Freedman M, Geller E. Midazolam versus propofol for long-term sedation in the ICU: a randomized prospective comparison. *Intensive Care Med*. 1997 Dec;23(12):1258-63.
- Wheeler DW, Thompson AJ, Corletto F, et al. Anaesthetic impairment of immune function is mediated via GABA_A receptors. *PLOS One*. 2011; 6(2): e17152.
- Wichterman KA, Baue AE, Chaundry IH. Sepsis and septic shock – A review of laboratory models and proposal. *J Surg Res*.1980;29:189-201.
- Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, Olney JW. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol*. 2005 Sep;146(2):189-97.
- Yuki K, Soriano SG, Shimaoka M. Sedative drug modulates T-cell and lymphocyte function-associated antigen-1 function. *Anesth Analg*. 2011 Apr;112(4):830-8.
- Zavala F, Veber F, Taupin V, Nguyen AT, vDescamps-Latscha B. A physiological role for the peripheral benzodiazepine receptor on human neutrophils. *Ann N Y Acad Sci*. 1992 Apr 15;650:229-33.