

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Encefalopatia Associada a Sepsis: Disfunção Comportamental, Metabólica e Mitocondrial em Modelo de Sepsis Abdominal

Renata Carnevale Carneiro Chermont de Miranda

Rio de Janeiro

Setembro de 2010

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

M672

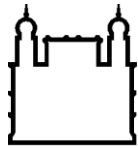
Miranda, Renata Carnevale Carneiro Chermont de

Encefalopatia Associada a Sepsis : disfunção comportamental metabólica e Mitocôndrial em Modelo de Sepsis Abdominal / Renata Carnevale Carneiro Chermont de Miranda. – Rio de Janeiro, 2010.
xii, 66 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2010.
Bibliografia: f. 50-61

1. Delirium. 2. Sepsis. 3. Estresse oxidativo. 4. Modelo experimental.
5. Disfunção mitocondrial. I. Título.

CDD 616.861



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Renata Carnevale Carneiro Chermont de Miranda

Encefalopatia Associada a Sepsis: Disfunção Comportamental Metabólica e Mitochondrial em Modelo de Sepsis Abdominal

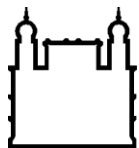
Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

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

Dr. Fernando Augusto Bozza

Rio de Janeiro

2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Renata Carnevale Carneiro Chermont de Miranda

Encefalopatia Associada a Sepsis: Disfunção comportamental metabólica e mitocondrial em modelo de sepse abdominal

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

Dr. Fernando Augusto Bozza

Data aprovação: 2809/2010

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Milton Osório de Moraes – **Presidente**

Dr. Joari Marques de Miranda

Dr. Otelo Rigato

Rio de Janeiro, 28 de Setembro de 2010

ÍNDICE

	Página
Lista de abreviaturas	vii
Lista de figuras e tabelas	x
Resumo	Xiii
Abstract	Xiv
1 – Introdução	1
1.1 - Definições de sepse	2
1.2 - Epidemiologia da sepse	4
1.3 – Fisiopatologia da sepse	8
1.4 – Encefalopatia associada a sepse	13
1.5 – Modelos experimentais	17
2 – Objetivos	20
2.1 – Objetivo geral	
2.2 – Objetivo específico	
3 – Materiais e métodos	21
3.1 – Desenho experimental	21
3.2 – Animais	22
3.3 – Preparo e injeção de fezes	22
3.4 - Medida da pressão arterial	22
3.5 - Análise de lactato	23
3.6 – Análise da celularidade total e diferencial	23

3.7 – Análise bioquímica	23
3.8 – Dosagem de citocinas	24
3.9 – Análise microbiológica	24
3.10 – Obtenção de fatias de cérebro	24
3.11 - Dano cognitivo	25
3.12 – Captação de glicose	25
3.13 – Consumo de oxigênio	25
3.14 – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico	26
3.15 – Análise estatística	26
4 – Resultados	27
4.1 – Análise de sobrevida	27
4.2 – Análise clínica e metabólica	27
4.3 – Análise bioquímica	29
4.4 – Dosagem de citocinas	31
4.5 – Análise de celularidade total e diferencial	32
4.6 – Análise microbiológica	34
4.7 – Dano cognitivo	34
4.8 – Captação de glicose/ consumo de oxigênio	35
4.9 – Avaliação de estresse oxidativo	37
5 – Discussão	39
6 – Conclusão	49
7 - Referências Bibliográficas	50
Anexo 1: artigo: Early Fluid Resuscitation in Sepsis: Evidence and Perspectives.	63

Lista de abreviaturas:

ACCP/SCCM – Colégio Americano de Médicos do Tórax/Sociedade Americana de Medicina Intensiva
(*American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*)

ADP – adenosina 5'-difosfato

ANOVA – *analysis of variance*

ATP – adenosine 5'-trifosfato

bpm – batimentos por minuto

BSA – Doro de albumina bovina (*Bovine Serum Albumine*)

CAM - Método de avaliação de delirium (*Confusion Assesmente Method*)

CASP – Peritonite por stent em colon ascendente (*Colon Ascendent Stent Peritonitis*)

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

CLP - ligadura e punção cecal (*cecal ligation and puncture*)

Cont – Controle

CTE - Cadeia Transportadora de Elétrons

DNA – ácido desoxirribonucléico

DSM – Manual estatístico e de diagnóstico de desordens mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Didordes*)

EAS – Encefalopatia Associada à Sepsis

EEG - Eletroencefalograma

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

e-NOS – Óxido nítrico sintase endotelial (*endotelial Nitric Oxide sintase*)

EUA – Estados Unidos da América

FADH₂ – Dinucleotídeo adenina flavina (*Flavine Adenine Dinucleotide*)

FCCP - carbonil cianeto p-(trifluorometoxi)fenilhidrazona

FiO₂ – fração inspirada de oxigênio

HEPES-NAOH – 10mM AC 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-2-etilsufônico

HMGB-1 - *high mobility group box 1*

ICAM-1 – molécula de adesão intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule-1*)

IL – interleucina (*interleukin*)

irpm – incursões respiratórias por minuto

LPS – lipopolissacarídeos (*lipopolysaccharide*)

MDA - Malondialdeído

MCP-1 – proteína quimiotática para monócito-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*)

MIP-1 – proteína inflamatória de macrófago-1(*macrophage inflammatory protein-1*)

N – Normal

NADH – Dinucleotídeo adenina nicotinamida (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

NFkB - fator nuclear-kB (*nuclear factor-κB*)

NK – *natural killer* (célula)

NO – Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

O₂ - oxigênio

O₂⁻ - ânion superóxido

PAMP – Padrões moleculares associados a microorganismos (*Pathogen Associated Molecular Pattern*)

PCRt - proteína C reativa titulada

PRR – Receptores de reconhecimento de padrão (*Pattern Recognition Receptors*)

RNA_m – Ácido Ribonucleico mensageiro

RNM – Ressonância Magnética

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

RPM – Rotações Por Minuto

SARA – Síndrome de Angustia Respiratória Aguda

SDOM - Síndrome de Disfunção Orgânica Múltipla

SIRS – Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (*systemic inflammatory response syndrome*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SOFA – Avaliação de Disfunção Orgânica relacionada à Sepse (*Sepsis-related Organ Failure Assessment*)

sTREM-1 - receptor solúvel de desencadeamento expresso em células mieloides (*Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells*)

TBARS – Substância reativas do ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

TF - fator tecidual (*Tissue Factor*)

TFPI – Inibidor da via do fator tecidual (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*)

TGO – Transaminase Glutâmico-Oxalacética

TGP – Alanina Aminotransferase

TLR – receptor tipo Toll (*Toll-like receptor*)

TNF - fator de necrose tumoral – (*tumor necrosis factor*)

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo

6- NBDG – 6-[N-(7-nitrobens-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-6-amino]

Lista de Figuras e Tabelas:

Tabela e Figuras	Página
Tabela 1.1: SOFA: avaliação da disfunção orgânica múltipla por sistema de pontos	3
Tabela 1.2: Mortalidade hospitalar comparativa entre diferentes estudos epidemiológicos referentes à sepse, sepse grave e choque séptico.	6
Figura 1.1: Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial	12
Figura 1.2: Interações sistêmicas na fisiopatologia da disfunção orgânica múltipla	13
Figura 1.3: Fatores envolvidos na fisiopatologia da encefalopatia associada a sepse	17
Figura 3.1: Desenho experimental	21
Figura 4.1: Análise de sobrevivência	27
Figura 4.2: Medida da pressão arterial sistólica em animais sépticos	28
Figura 4.3: Dosagem de lactato sérico	29
Figura 4.4: Avaliação da disfunção renal em animais sépticos	30
Figura 4.5: Avaliação da disfunção hepática em animais sépticos	30
Figura 4.6: Concentração de citocinas no plasma de animais sépticos	31
Figura 4.7: Concentração de citocinas no líquido peritoneal de animais sépticos	32
Figura 4.8: Avaliação da celularidade total e diferencial no sangue de animais sépticos	33
Figura 4.9: Avaliação de celularidade total e diferencial no líquido peritoneal de animais sépticos	34
Figura 4.10: Dano cognitivo em animais que sobreviveram a sepse	35
Figura 4.11: Captação de glicose no cérebro de animais sépticos	36
Figura 4.12: Consumo de oxigênio no córtex cerebral	37
Figura 4.13: Produção de estresse oxidativo em diferentes estruturas cerebrais de animais sépticos	38

Agradecimentos

Aos meus orientadores Fernando Bozza e Hugo Caire que me ensinaram muito e foram grandes amigos durante a elaboração desta tese.

A Rose Branco e Daniele Lobato pela boa vontade sempre.

Aos colegas do laboratório de Imunofarmacologia e de Bioquímica que souberam entender as minhas limitações e cooperaram de maneira fundamental para esta tese. Gostaria de destacar o Rodrigo Amâncio, André Japiassu, Rachel Novaes, Patrícia Reis e Marcus Oliveira.

Aos meus sogros pelo carinho e respeito.

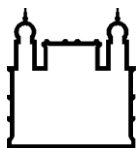
Aos meus amigos pela compreensão nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais por terem me dado a oportunidade de chegar até aqui.

Ao meu irmão por me mostrar sempre um lado diferente da vida.

Ao meu marido, Lula, pelo amor e apoio incondicionais.

A Deus por ter colocado todas essas pessoas na minha vida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

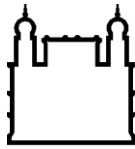
Encefalopatia Associada a Sepsis: Disfunção Comportamental, Metabólica e Mitocondrial em Modelo de Sepsis Abdominal

Resumo

A sepsis e síndrome de disfunção orgânica múltipla representam um problema clínico de alta relevância, principalmente devido a sua grande incidência em pacientes críticos e aos seus altos índices de mortalidade. Apesar de medidas terapêuticas terem sido capazes de diminuir a mortalidade, observamos que muitos sobreviventes a sepsis não são capazes de retomar suas atividades usuais. Estudos experimentais em animais são uma ferramenta importante para o estudo da fisiopatologia e da terapêutica da sepsis. A encefalopatia associada à sepsis (EAS) é muitas vezes a primeira disfunção orgânica a se manifestar. Clinicamente pode se apresentar como sonolência, agitação, delírio e coma. A presença da EAS está associada a maior mortalidade e pior prognóstico. Muitos pacientes apresentam dano cognitivo a médio e longo prazo que pode ser irreversível.

Neste trabalho, padronizamos o modelo de injeção de fezes intraperitoneal em camundongos Swiss para facilitar o estudo da EAS. No modelo utilizado podemos caracterizar o choque com queda da pressão arterial 6 e 24h após a indução da sepsis, disfunção metabólica caracterizada pelo aumento de lactato, disfunção hepática e renal com aumento de uréia, creatinina, TGO e TGP em 24h. A resposta inflamatória foi caracterizada pelo aumento de citocinas plasmáticas e no líquido peritoneal. IL-6 e MIP-1 α aumentaram em 6h e 24h tanto no plasma quanto no líquido peritoneal. IL-1 β , citocina de liberação precoce, teve aumento no plasma nas primeiras 6h. Leucócitos totais, mononucleares e neutrófilos diminuíram no plasma nas primeiras 6h com tendência a recuperação em 24h. No líquido peritoneal há um aumento na contagem de leucócitos, mononucleares e neutrófilos mais evidente em 24h. Dano cognitivo foi verificado em animais sobreviventes após 10 dias do insulto da sepsis. Observamos aumento no consumo de oxigênio pelo córtex cerebral em 6h e seguido de queda em 24h. Houve aumento na captação de glicose pelo cérebro tanto em 6h e 24h. Aumento no dano oxidativo foi verificado a partir do aumento de TBARS em 6h nas regiões pré frontal, estriado, córtex e cerebelo.

Concluímos que o modelo de injeção de fezes intraperitoneal é capaz de reproduzir a sepsis clínica nos aspectos inflamatórios e de disfunção orgânica. O modelo também foi capaz de reproduzir a EAS com dano cognitivo, alterações no consumo de oxigênio pela mitocôndria, no metabolismo da glicose e de estresse oxidativo no cérebro. Mudanças no metabolismo energético, associado a aumento no consumo de glicose pelo córtex cerebral, além da resposta inflamatória propiciaram o estresse oxidativo. O conjunto de alterações observadas pode justificar o desenvolvimento de dano cognitivo persistente observado tanto neste modelo quanto na clínica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Sepsis associated encephalopathy: behavioral, metabolic and mitochondrial dysfunction in a model of abdominal sepsis

Abstract

Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome represent a clinical problem of great importance, mainly due to its high incidence in critical patients and its high mortality. Although therapeutic measures have been able to reduce mortality, many sepsis survivors are not able to regain their usual activities. Experimental trials in animals are an important tool to study the pathophysiology and the treatment of sepsis. The sepsis associated encephalopathy is often the first organ dysfunction to arise. Clinically it may present as drowsiness, agitation, delirium and coma. The presence of sepsis associated encephalopathy is associated with increased mortality and worse prognosis. Many patients persist with cognitive impairment that may be irreversible.

In this study, we established a model of abdominal sepsis in mice that facilitates the study of sepsis associated encephalopathy. From this model we detected cognitive impairment on the animals that survived sepsis, and acute changes related to sepsis associated encephalopathy as mitochondrial dysfunction, metabolic changes and oxidative damage. This model is characterized by the drop of blood pressure 6 and 24h after induction of sepsis, increased blood lactate and increased urea, creatinine, AST and ALT at 24 hours. Inflammation was characterized by increased inflammatory cytokines in plasma and peritoneal fluid. IL-6 and MIP-1 α increased at 6h and 24h in both plasma and peritoneal fluid. IL-1 β , an early release cytokine, was increased in plasma on the first 6h. Total leukocytes, mononuclear cells and neutrophils decreased in plasma during the first 6 hours with a tendency to recovery at 24 hours. Peritoneal fluid leukocytes, mononuclear cells and neutrophils increased markedly at 24h. We observed an increase in oxygen consumption by cerebral cortex in 6 h and then decreased at 24 hours. There was an increase in glucose uptake by the brain in both 6h and 24h. Oxidative damage was assessed by the increase of TBARS in 6h at the pre frontal regions, nucleus striatum, cortex and cerebellum. Cognitive impairment was observed in animals that survived 10 days after the insult of sepsis.

We conclude that this model was able to reproduce inflammatory aspects and organ dysfunction observed in sepsis. The model was also able to reproduce sepsis associated encephalopathy and changes in cognitive damage, oxygen consumption, glucose metabolism and oxidative damage. Bioenergetic damage associated with high glucose uptake and inflammatory response led to oxidative damage. These acute changes may be responsible for the cognitive damage observed at this model and on clinical practice.

1. INTRODUÇÃO

Sepse e síndrome de disfunção orgânica múltipla (SDOM) são as principais causas de morte em terapia intensiva (Martin e cols., 2003). O tratamento atual para a seps e suas conseqüências se baseia em recomendações de controle da infecção, otimização hemodinâmica e terapias de suporte (Dellinger e cols.; 2004), e a implementação destas medidas foram capazes de diminuir a mortalidade da seps e. Mesmo assim, o número absoluto de mortes por seps e vem aumentando já que a incidência da seps e é crescente (Vincent e cols.; 2006). Adicionalmente, passamos a observar que esse aumento na sobrevida nem sempre se reflete em qualidade de vida e muitos pacientes não são capazes de retomar suas atividades usuais após o período de internação na terapia intensiva (Hopkins e cols.; 2006).

Cerca de 70% dos pacientes sépticos desenvolvem algum grau de disfunção cerebral aguda. No longo prazo esses pacientes podem apresentar déficit de memória e até mesmo evolução para demência (Hopkins e cols.; 2006). A encefalopatia parece estar relacionada a um processo de inflamação cerebral, sem evidência de infecção local, que pode se manifestar como distúrbio de atenção, desorientação, delirium, sonolência até coma (Lacobone e cols.; 2009). Muitas vezes a avaliação clínica desses pacientes encontra-se prejudicada devido ao uso disseminado de sedação no ambiente de terapia intensiva.

O conhecimento da fisiopatologia da encefalopatia associada à seps e (EAS) ainda é bastante limitado. O desenvolvimento de novos modelos experimentais que sejam clinicamente relevantes e reproduzam o acometimento cerebral da seps e em humanos podem ajudar no esclarecimento dos mecanismos envolvidos. O cérebro pode ser afetado pela resposta inflamatória sistêmica de diferentes formas. A quebra da barreira hematoencefálica pode ser um dos mecanismos centrais que favorecem a neuroinflamação na seps e. A quebra dessa barreira física permite que substâncias neurotóxicas extravasem para o parênquima cerebral. Há geração de citocinas locais, alterações de microcirculação e desequilíbrio de neurotransmissores (Lucas e cols.; 2006).

Esta tese propõe a padronizar um modelo experimental de seps e polimicrobiana em murinos que dispensa o uso de drogas neurotóxicas como anestésicos, e está associada a evolução para disfunção orgânica múltipla. Com esse modelo pretendemos caracterizar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da EAS. Neste estudo focamos no dano cognitivo presente em animais que sobreviveram a seps e, e em alterações agudas no tecido cerebral como disfunção mitocondrial, metabólica e estresse oxidativo.

1.1 Seps e - definições

As primeiras definições de sepse vêm provavelmente dos gregos antigos que usavam os termos “carne podre” ou putrefação. Em 1680 ocorreram as primeiras descrições de bactérias, ou animalcules, feita por Leeuwenhoek, porém a associação de bactéria com processo infeccioso só ocorreu 200 anos depois com Pasteur. Em 1914, Schottmueller relatou que a liberação de microorganismos patogênicos na corrente sanguínea era responsável por sinais e sintomas sistêmicos propondo pela primeira vez o conceito mais moderno de sepse (Vincent e col.; 2006)

Desde então, diversas terminologias como sepse, septicemia e síndrome séptica foram utilizadas para descrever a sepse. A fim de uniformizar a terminologia relacionada à sepse, em 1991, membros da ACCP/SCCM se reuniram para estabelecer uma definição conceitual e clínica da síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e sepse. O uso dessas definições visa ajudar clínicos e pesquisadores que trabalham com sepse. A padronização cria critérios específicos para o diagnóstico, estratifica quanto à gravidade e permite a inclusão e análise de pacientes em ensaios clínicos.

A SIRS ocorre devido a uma grande variedade de insultos clínicos como pancreatite, trauma, grande queimado e infecção. Seu diagnóstico é estabelecido quando dois dos seguintes critérios estão presentes:

- Temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$.
- Frequência cardíaca $>90\text{bpm}$
- Frequência respiratória $>20\text{irpm}$ ou $\text{PaCO}_2 < 32$
- Leucócitos >12000 ou $<4000\text{cels}/\text{mm}^3$ ou $>10\%$ de bastões

Quando a SIRS ocorre devido a uma infecção, temos o diagnóstico de sepse.

Sepse associada à disfunção orgânica e sinais de hipoperfusão caracteriza a sepse severa.

O choque séptico é a hipotensão associada à sepse que não responde a reposição volêmica adequada (Members of the American College of Chest Physicians e cols., 1992).

A síndrome de disfunção orgânica múltipla (SDOM) caracteriza-se pela falha seqüencial de órgãos e sistemas não necessariamente envolvidos no foco primário da infecção. A resposta inflamatória sistêmica na sepse gera mediadores que juntos com o estado de hipoperfusão e hipercoagulabilidade podem produzir danos em todo o organismo. Uma das primeiras disfunções observadas é a cerebral, com confusão mental, delirium e até coma. Hipotensão, insuficiência respiratória, renal, metabólica e hepática são alguns outros exemplos. A disfunção orgânica pode ser caracterizada por uma escala de pontuação, para avaliação de disfunção orgânica relacionada à sepse (SOFA) (tabela 1.1) (Vincent e cols.,

1996). Nesta, as principais disfunções orgânicas são pontuadas de acordo com a gravidade. Pontuações mais altas estão relacionadas ao pior prognóstico.

Tabela 1.1: SOFA, avaliação da disfunção orgânica múltipla por sistemas de postos

SISTEMAS	1 ponto	2 pontos	3 pontos	4 pontos
Respiratório PO ₂ /FIO ₂	<400	<300	<200	< 100
Neurológico	Glasgow 13-14	Glasgow 10-12	Glasgow 6-9	Glasgow <6
Cardiovascular	Pressão arterial média <70mmHg	Uso de dopamina ou dobutamina	Noradrenalina <0,1 mcg/kg/min	Noradrenalia >0,1 mcg/kg/min
Hepático	Bilirrubina 1,2-1,9mg/dl	Bilirrubina 2,0 – 5,9mg/dl	Bilirrubina 6,0 – 11,9mg/dl	Bilirrubina >12mg/dl
Coagulação	Plaquetas <150000/mm ³	Plaquetas <100000/ mm ³	Plaquetas <50000/ mm ³	Plaquetas <20000/ mm ³
Renal Creatinina	1,2 – 1,9mg/dl	2,0 – 3,4mg/dl	3,5 – 4,9mg/dl	>5mg/dl

Apesar de alta sensibilidade, as definições de 1991 são pouco específicas e por isso alvo de críticas. Estudos mais recentes relacionam marcadores biológicos com diagnóstico e prognóstico da sepse. Alguns exemplos são os marcadores de superfície de leucócitos, interleucinas (IL), fator de necrose tumoral α (TNF α), proteína C reativa (PCRt), procalcitonina, sTREM-1 (receptor solúvel de desencadeamento expresso em células mieloides) entre outros (Lever e cols., 2007). Desses, a procalcitonina é o que apresenta maior sensibilidade e especificidade para detectar sepse (Gerlach e cols., 2004).

Diante desses dados uma nova conferência foi realizada em 2001 para rever as definições e critérios de sepse de dez anos atrás (Levy e cols., 2003). Nesse momento a inclusão de biomarcadores no diagnóstico da sepse foi discutida. Após ampla revisão da literatura, o grupo achou que essa medida ainda não seria adequada e as definições originais se mantiveram apesar das críticas. Porém, o grupo sugere um sistema de classificação baseado na **Predisposição**, **Insulto infeccioso**, **Resposta do hospedeiro** e **disfunção Orgânica** ou **PIRO**. Neste novo sistema, a predisposição avalia patologias associadas que podem ter impacto na sepse modificando o processo da doença e a sua terapia, como a imunossupressão ou polimorfismos genéticos em componentes da resposta inflamatória. O insulto Infeccioso

identifica bactérias e outros patógenos assim como o sítio de infecção, além de produtos microbianos como LPS e DNA bacteriano. A resposta refere a marcadores de resposta do hospedeiro que podem ser clínico como choque ou laboratorial como PCR, IL6 e procalcitonina. Por fim, a disfunção orgânica identifica a presença de alterações funcionais em órgãos através de scores como o SOFA, ou por resposta celular ao insulto, como apoptose e stress celular.

Alguns desses critérios sugeridos no PIRO não estão disponíveis na prática clínica da maioria dos centros de terapia intensiva. O diagnóstico à beira do leito deve priorizar critérios simples, de alta sensibilidade, prejudicando o menos possível a especificidade. Os critérios não devem deixar dúvida uma vez que a abordagem precoce da sepse pode mudar o prognóstico do paciente (Levy e cols.; 2003).

1.2 Epidemiologia

A sepse é a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva. Anualmente, nos Estados Unidos (EUA) 750.000 pessoas têm sepse e desses 210.000 morrem. A idade média dos pacientes sépticos é de 60 anos e vem aumentando à medida que a população envelhece. Sepse tende a ocorrer mais tardiamente em mulheres. (Martin e cols., 2003). A mortalidade permanece alta apesar de avanços em suporte e tratamento desses pacientes tornando a sepse um problema de saúde pública.

A mortalidade da sepse aumenta progressivamente com a idade, sendo de 10% em crianças e chegando a 38,4% nos pacientes com mais de 85 anos. Esse número pode ser maior dependendo das comorbidades do paciente. A mortalidade é progressiva de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico: 7%, 16%, 20% e 46% respectivamente (Rangel-Frausto e cols, 1995). Nos EUA o tempo médio de permanência hospitalar do paciente séptico é de 19,6 dias e o custo médio de U\$ 22.000,00. O tempo de permanência não é muito diferente entre sobreviventes e não sobreviventes, porém os não sobreviventes estão associados a um maior custo. O mesmo ocorre em pacientes com número maior de disfunção orgânica. O tempo de permanência é parecido, porém o custo sobe de U\$ 19.500,00 para aqueles pacientes com uma disfunção para U\$32.800,00 para aqueles pacientes com 4 ou mais disfunções orgânicas (Angus e cols.; 2001).

As diferenças de mortalidade por sepse grave de estudos ao redor do mundo estão representadas na Tabela 1.2. Na França, a mortalidade da sepse é de 35% em 30 dias e de 41,9% em dois meses. 14% dos pacientes admitidos em terapia intensiva preenchem critérios para sepse grave ou choque séptico (Brun-Buisson e cols., 2004). No Reino Unido, 46% das diárias de Terapia Intensiva são utilizadas por pacientes sépticos (Blanco e cols, 2008). Na

Espanha a mortalidade da sepse grave pode atingir 54% (Blanco e cols., 2008). A incidência de sepse grave na Alemanha é de 76 a 110 casos por 100.000 habitantes e a mortalidade é de 55% (Engel e cols., 2007).

No período de 2004 a 2007 estudos prospectivos foram publicados mostrando dados referentes ao Brasil. O primeiro deles, BASES (Silva e cols., 2004), a idade média dos pacientes era de 65,2 anos. Dos 884 pacientes que permaneceram internados por mais de 24 horas, 241 (27,3%) desenvolveram sepse grave e 203 (23%) desenvolveram choque séptico. A mortalidade foi de 47,3% e 52,2% respectivamente.

O Sepse Brazil (Sale e cols., 2006) reuniu 3128 pacientes sépticos em 65 hospitais. A mortalidade em 28 dias foi de 46,6% chegando a 65,3% no choque séptico. A mortalidade foi maior em hospitais do Norte, nordeste e centro-oeste. O estudo Progress (Beale e cols., 2003) envolveu 36 países. Sete Unidades de Tratamento Intensiva (UTI) brasileiras foram incluídas. A mortalidade no Brasil foi de 56%, ficando muito acima dos países desenvolvidos (30%) e de outros países em desenvolvimento (45%).

Mais recentemente o estudo COSTS (Sogayar e cols., 2008) incluiu 21 Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. A mortalidade foi de 44,3% e o custo global de U\$ 10.595,00. O custo diário desses pacientes é de U\$1.028,00 e esses custos não diferem muito entre instituições públicas e particulares.

Em 2002, a Sociedade Européia de Terapia Intensiva, o Forum Internacional de Sepse e a Sociedade de Medicina Intensiva, na esperança de melhorar o tratamento do paciente séptico, se reuniram para formar a Campanha Sobrevivendo a Sepse (Dellinger e cols., 2004). Usando dados de medicina baseada em evidência, elaboraram um guia de recomendações para o tratamento da sepse. A implementação e divulgação de protocolos baseados nas recomendações é parte essencial da campanha. De 2005 a 2008 hospitais em todo mundo foram analisados quanto à utilização desses protocolos e resultados. 15022 pacientes de 165 hospitais foram incluídos. A mortalidade caiu de 37% para 30,8% com a implementação da campanha. Esta diminuição está diretamente relacionada às taxas de adesão de cada unidade (Mitchel e cols., 2010).

Apesar do avanço que a implementação de protocolos pode representar para a questão de mortalidade na sepse, a qualidade de vida após a sepse não parece ser afetada de maneira significativa, uma vez que muitos pacientes sobreviventes não são capazes de retomar as suas atividades usuais. Cerca de um terço dos pacientes em terapia intensiva desenvolve dano cognitivo a longo prazo que pode ser irreversível. 35% permanecem com dificuldade de exercer tarefas funcionais como planejamento e capacidade de tomar decisões 9 meses após a alta da unidade de terapia intensiva (Hopkins e cols.; 2009)

Tabela 1.2: Mortalidade hospitalar comparativa entre diferentes estudos epidemiológicos referentes à sepse, sepse grave e choque séptico.

Autor Principal	Ano	N pacientes	País	Mortalidade		
				Sepse	Sepse Grave	Choque Séptico
Greenman	1991	226	EUA	41%		
Ziegler	1991	543	EUA	43%		
Rangel-Frausto	1995	467	EUA	16%	20%	46%
Brun-Buisson	1995	1052	França	-	56%	71%
Salvo	1995	67	Itália	36%	52%	81,8%
Sands	1997	1342	EUA	34%		
Angus	2001	192980	EUA		28,6%	
Alberti#	2002	3239	Europa	17-50%	25,5-56,3%	45,7-66,8%
Martin*	2003	4068819	EUA	17,9%		
Annane	2003	8251	França	-	-	61,2%
Padkin	2003	15362	Reino Unido		47,3%	
Brun-Buisson	2004	546	França	-	41,9%	-
Finfer	2004	691	Anzics ¹	-	37,5%	-
Silva	2004	241	Brasil	33,9%	46,9%	52,2%
Flaatten	2004	6665	Noruega	13,5%	27%	29,3%
Sundararajan	2005	33741	Austrália	10,2%	31,1%	-
Adrie	2005	713	França	-	39%	-

Tanriover	2005	63	Turquia	-	87,3%	-
Záhorec	2005	124	Rep. Eslovaca	-	51,2%	-
Sales Júnior	2006	521	Brasil	16,7%	34,4%	65,3%
Cheng	2007	318	China	-	48,7%	-
Engel	2007	415	Alemanha	-	55,2%	-
Moreno†	2008	2052	Global	35,4%	44,9%	52,5%
Ballester	2008	33767	Espanha	-	42,5%	-
Blanco	2008	311	Espanha	-	54,3%	-
Rezende	2008	342	Brasil	-	64%	-
PROGRESS	2009	12570	Global	-	49,6%	-
PROGRESS ††	2009	969	Brasil	-	67,4%	-
Kwannimit	2009	390	Tailândia	-	21,8%	44,2%
Levy	2010	15022	Global	-	30,8%	-
Castellanos	2010	384	Espanha	-	-	37,5%
Total	91- 2010	4393558	-	-	19%	-
Excluindo-se Martin 2003	91- 2009	324739 ‡			32,9%‡	
Estudos brasileiros	2004- 09	2073 ‡‡			59,1% ‡‡	

[†]Anzics - Australian and New Zealand Intensive Care Society; EUA – Estados Unidos da América; PROGRESS - *Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis*; # - mortalidade foi classificada de acordo com presença ou ausência de infecções adquiridas na enfermagem e na UTI; * - correspondente ao ultimo período de observação do estudo (1995-2000); † - parte do estudo multicêntrico SAPS 3; †† - parte do estudo multicêntrico

PROGRESS, com dados do desfecho de pacientes sépticos oriundos do Brasil; ‡ - Taxa calculada excetuando o estudo de Martin e cols., 2003; ‡‡ - Taxa calculada apenas com estudos brasileiros.

1.3 Fisiopatologia da Sepses

1.3.1 Resposta Inflamatória

A resposta do hospedeiro na sepsis começa com receptores de reconhecimento de padrão (PRR) que podem ser de três famílias: 1) receptores Toll Like (TLR); 2) proteínas repetidoras de domínio de oligomerização de nucleotídeo rico em leucina (NOD-LRR); 3) ativadores de caspase. Padrões moleculares associados a microorganismos (PAMP) se ligam aos PRRs que também são capazes de reconhecer sinalizadores endógenos como proteínas de choque térmico, fibrinogênio, fibronectina, HMGB-1 entre outros (Cinal e cols., 2009).

Receptores TLR induzem uma cascata de sinalização intracelular e ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear $\text{K}\beta$ ($\text{NFK}\beta$) que migra do citoplasma para dentro do núcleo, se liga a sítios de transcrição e ativa genes responsáveis pela síntese de proteínas de fase aguda, óxido nítrico (NO), fatores de coagulação e citocinas. Dentre as citocinas envolvidas na sepsis, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ são as mais precocemente liberadas. São responsáveis pelo aumento da expressão de moléculas de adesão, que vão resultar em migração celular para os tecidos e estimulam a produção de IL-6 e IL-10 (Thijs e cols., 1995). A IL-6 é capaz de ativar o gene da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) em células endoteliais favorecendo a migração de neutrófilos além de inibir a apoptose de neutrófilos aumentando a sua sobrevivência e colaborando assim para o processo inflamatório (Taneja e cols., 2004).

IL-6 aumenta dois a três dias após o início da sepsis e pode ser usado como preditor de SDOM e mortalidade hospitalar. (Pinsky e cols., 1993; Bernard e cols., 2001; Frink e cols., 2009). Não sobreviventes têm IL-6 mais elevada do que os sobreviventes (Oda e cols., 2005) e pacientes com pneumonia comunitária grave que tiveram alta hospitalar ainda com níveis elevados de IL-6 apresentam menor sobrevivência em um ano (Yende e cols., 2008).

As caspases têm função de citocina pró inflamatória, facilitando a eliminação de microorganismo e a produção de espécies reativas de oxigênio. São importantes no processo de apoptose, regulação celular e inflamação. Um dos seus principais alvos é a enzima DNase ativada por caspase que é responsável pela fragmentação do DNA na morte celular programada (Cinel e cols., 2009).

Proteína inflamatória de macrófago 1α ($\text{MIP-1}\alpha$) é uma quimiocina pró inflamatória que aumenta a quimiotaxia de leucócitos. É capaz também de inibir a proliferação de células hematopoiéticas. Animais nocaute para $\text{MIP-1}\alpha$ têm resposta inflamatória ao vírus influenza

reduzida e se tornam resistentes a miocardite induzida pelo coxsackievirus que ocorre por mecanismo autoimune (Opal e cols., 1998).

Dentre as citocinas antiinflamatórias, IL-10 desempenha papel fundamental. É produzida por células B, linfócitos T, macrófagos, monócitos, neutrófilos e células epiteliais. Liga-se diretamente a receptores celulares e inibe a ativação do NFK β e conseqüentemente a produção de citocinas pró inflamatórias e óxido nítrico (Opal e cols., 1998). IL-10 é capaz de desativar macrófagos, impede quimiotaxia e degranulação de neutrófilos e contrapõe o aumento de sobrevivência de neutrófilos induzidos por outras citocinas.

Diversas outras citocinas pró e antiinflamatórias são liberadas na sepse e o desequilíbrio entre elas favorece a inflamação com migração e adesão de neutrófilos e monócitos, ativação de macrófagos e alteração da permeabilidade vascular, disfunção endotelial, além de vasodilatação arteriolar.

1.3.2 Coagulação

Existem inúmeras evidências que correlacionam inflamação e coagulação. Inflamação sistêmica é capaz de iniciar a cascata de coagulação, assim como a coagulação é capaz de perpetuar o estado pró inflamatório. A disfunção endotelial está intimamente relacionada com a agregação plaquetária e formação de microtrombos (Levi e cols., 2010). Além de atividade procoagulante exagerada, durante a sepse, vias anticoagulantes encontram-se deficientes. A atividade procoagulante costuma ser regulada por três vias fisiológicas anticoagulantes: antitrombina, proteína C e inibidor da via do fator tecidual (TFPI). Na sepse essas três vias estão deficientes, favorecendo o estado pró-coagulante. Níveis de antitrombina encontram-se baixos pela diminuição na síntese e aumento na degradação. A via da proteína C encontra-se deficiente desde a síntese, passando pela sua ativação, ligação com a proteína S, até a regulação negativa de seus receptores. O papel do TFPI na sepse ainda não foi bem esclarecido, mas a sua administração no estado recombinante bloqueia a produção de trombina induzida pela inflamação. Além disso, a fibrinólise, durante o processo inflamatório, encontra-se completamente deficiente, não é capaz de remover a fibrina e favorece a trombose microvascular (Gando e cols., 2010).

1.3.3 Alterações no metabolismo energético na inflamação

O conjunto de alterações inflamatórias e trombóticas na microcirculação leva a uma limitação na oferta de oxigênio (O₂) principalmente na fase aguda da sepse. Neste momento,

medidas que aumentem a oferta de O_2 para os tecidos parecem ser muito eficientes em diminuir a resposta inflamatória exagerada na sepse (Rivers e cols., 2007). Após a fase aguda, o aumento na oferta de O_2 não é vantajoso e o que se observa é uma queda na utilização de O_2 a nível celular, conhecido como hipóxia citopática (Fink; 2001). Uma vez que a maior parte da utilização de oxigênio celular ocorre em uma organela particular chamada mitocôndria, parece bastante plausível que as alterações na tensão de oxigênio observadas na sepse sejam decorrentes de alterações funcionais nesta organela.

A mitocôndria desempenha um papel central na homeostase energética e redox celular, uma vez que é responsável pela produção de pelo menos 90% do ATP celular (Saraste; 1999) e de uma quantidade significativa de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Halliwell; 2006). A produção de ATP por esta organela se dá por um processo que envolve a utilização de O_2 e é conhecido como fosforilação oxidativa. Neste processo, os elétrons oriundos do metabolismo de nutrientes reduzidos, são encaminhados até os complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE) tendo como destino final o oxigênio. Ao longo deste transporte, a energia dos elétrons é utilizada para a formação de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana interna mitocondrial. A síntese do ATP é mediada por um complexo proteico localizado na membrana interna mitocondrial, chamado ATP sintase, e que utiliza a energia do gradiente eletroquímico na produção e liberação do ATP da enzima. Uma representação esquemática deste processo é mostrada na figura 1.1 (Harrois e cols.; 2009).

A glicólise representa uma das vias metabólicas centrais no metabolismo energético celular uma vez que fornece poder redutor para a fosforilação oxidativa. Esta via metabólica é praticamente universal. A glicólise compreende um conjunto de 11 reações envolvidas na transformação de glicose em piruvato. De forma geral, as reações catalisadas pelas enzimas da glicólise envolvem a conversão do esqueleto carbônico da glicose em duas trioses e paralelamente, a produção de 2 moléculas de NADH, e quatro moléculas de ATP. No entanto, como as primeiras reações desta via são termodinamicamente desfavoráveis, há a necessidade de se utilizar duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose metabolizada. Assim, o saldo energético final desta via é de 2 moléculas de ATP para cada mol de glicose, um saldo bem menor comparado à oxidação completa da glicose pela fosforilação oxidativa (que pode produzir 34 ATPs/mol de glicose). Assim, esta via é considerada de baixa eficiência do ponto de vista energético, mas tem a vantagem de poder ocorrer em condições desfavoráveis, como por exemplo em hipóxia ou anóxia além do fato de produzir ATP mais rapidamente do que a fosforilação oxidativa. Na ausência de oxigênio, o piruvato é convertido, através da reação catalisada pela lactato desidrogenase, em lactato. Na presença de O_2 , o piruvato é completamente oxidado e descarboxilado na mitocôndria em CO_2 , NADH e FADH₂ através

das reações do ciclo de Krebs. As moléculas de NADH e FADH₂ são posteriormente oxidadas, transferindo seus elétrons para os complexos da CTE mitocondrial. Em situações de hipóxia/anóxia, que implicam numa redução significativa da fosforilação oxidativa, os níveis celulares de ATP não são significativamente alterados em alguns tecidos já que a metabolização da glicose através da fermentação é aumentada (Mayes e col.; 2003).

TNF- α e NO são capazes de inibir o carreamento de elétrons na cadeia respiratória. Quando a concentração de O₂ encontra-se baixa o NO se liga de forma reversível a cadeia respiratória mitocondrial. Quando em concentrações mais altas, o ON é capaz de se ligar ao ânion superóxido (O₂⁻), ambos abundantes na sepse, formando peroxinitrito (ONOO⁻). Peroxinitrito reage com a maioria dos componentes da cadeia transportadora de elétrons. Além disso, peroxinitrito aumenta a permeabilidade na membrana mitocondrial externa e consequentemente, a permeabilização da membrana interna, levando a dissipação do potencial de membrana e interrupção da transferência de elétrons (Horrois e cols., 2009).

Mudanças na estrutura da mitocôndria também são observadas durante a sepse. Há perda na estrutura da membrana e inchamento da mitocôndria (Singer e cols., 2007). Crouser e colaboradores (2002) foram capazes de mostrar uma correlação direta entre a severidade no acometimento da estrutura da mitocôndria e a magnitude de disfunção na respiração mitocondrial. Genes que codificam as enzimas da cadeia respiratória mitocondrial encontram-se pouco expressos na sepse (Singer e cols., 2007).

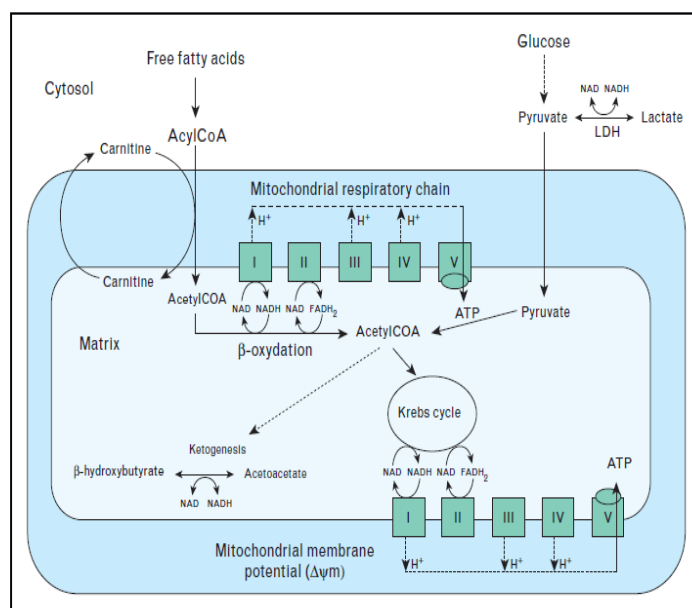


Figura 1.1: Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial. I, II, III e IV são complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial. β -oxidação e o ciclo de Krebs produzem NADH e FADH₂ que doam elétron para o complexo I e II respectivamente. O

Eletro transita para o complexo III e IV e gera um gradiente de prótons pela membrana interna. O gradiente de próton é transformado em ATP no complexo V (ATP sintase) Acylcoa, acyl coenzima A; FAD, dinucleotídeo flavina adenina (forma oxidada); FADH, flavina adenina forma reduzida); LDH, desidrogenase láctica; NAD, dinucleotídeo adenina nicotina (forma oxidada; NADH, nicotina adenina (forma reduzida) (Harrois e cols.; 2009).

Pode-se concluir que após todas as alterações descritas, a produção de ATP pela mitocôndria durante a sepse pode estar diminuída. A utilização de O₂ para produção de ATP por mitocôndrias do rim e cérebro diminui após 24h da indução de sepse (Mela e cols., 1983). Em modelo de sepse em rato, foi possível observar aumento na fosforilação nas primeiras 6h seguido de queda já em 18h (Ohtoshi e cols., 1984). O efeito do tempo de infecção na capacidade oxidativa da mitocôndria, também foi demonstrado através de ressonância por espectroscopia (Mizobata e cols., 1995). Rosser e colaboradores (1998) demonstraram um aumento máximo no consumo de O₂ por hepatócitos expostos a endotoxinas em 6h e depressão significativa desse consumo em 24h.

1.3.4 *Disfunção orgânica múltipla*

A maneira como as alterações agudas da sepse levam a SDOM não está completamente esclarecida. Um esquema fisiopatológico foi proposto na figura 1.2. O metabolismo energético celular e o sistema de oferta e demanda de ATP está diretamente envolvido (Carré e col.; 2008). Como não há evidência de morte celular nos órgãos acometidos pela sepse (Hotchkiss e cols.; 1999) acredita-se que a célula seja capaz de adaptar seu fenótipo, ocorre a hipóxia citopática e inabilidade da célula de utilizar oxigênio independente da oferta. Essa diminuição no metabolismo celular se assemelha à condição de hibernação que permite a sobrevivência de alguns animais em situações adversas (Singer e cols.; 2004).

No estudo de Brealey e colaboradores (2004), disfunção orgânica e pior prognóstico estão associados à super produção de óxido nítrico e disfunção mitocondrial. Nesse estudo, o complexo II, III e IV permaneceram inalterados enquanto a atividade de complexo I foi diminuindo de acordo com a severidade da sepse sendo associado à queda na concentração de ATP no fígado e músculo de ratos.

Em humanos, alterações mitocondriais durante a sepse foram demonstradas por Singer e colaboradores (2007). Há associação entre disfunção orgânica e disfunção mitocondrial. O aumento no tamanho da mitocôndria está associado ao pior prognóstico. Subunidades de proteínas da CTE encontram-se diminuídas principalmente nos não sobreviventes. RNAm do co-ativador transcricional da biogênese mitocondrial (PGC-1 α) e a

Mn-superóxido dismutase só estavam aumentados em sobreviventes sugerindo que a respostas antioxidantes e que estimulam a biogênese mitocondrial estão envolvidas com melhor prognóstico (Carré e cols.; 2010).

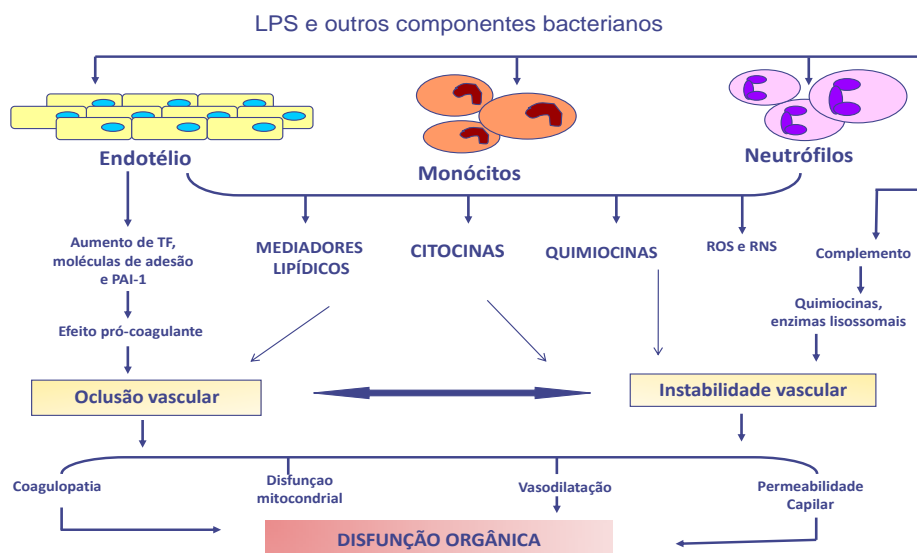


Figura 1.2: Interações sistêmicas na fisiopatologia da disfunção orgânica múltipla. ROS, espécies reativas de oxigênio; RNS, espécies reativas de nitrogênio; TF, fator tissular, PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio 1.

1.4 Encefalopatia Associada à Sepses

O acometimento cerebral na sepses, conhecido como EAS, é freqüente podendo atingir até 71% dos pacientes com sepses grave (Young e cols., 1990). A disfunção cerebral na sepses é precoce, sendo muitas vezes a primeira disfunção orgânica a se manifestar (Moreno e cols.; 1999). A presença de disfunção cerebral está associada a pior prognóstico (Sprung e cols., 1990), maior mortalidade em 30 dias (Russel e cols.; 2000) e é um preditor independente de pior desfecho nos pacientes sépticos (Sharshar e cols., 2007). EAS clinicamente caracteriza-se por pensamento lentificado, desorientação, delirium, crise convulsiva e até coma.

Recentemente, o delirium em pacientes ventilados mecanicamente foi diretamente relacionado com o dano cognitivo a médio e longo prazo (Girard e cols.; 2010). A performance cognitiva dos pacientes foi analisada em 3 e 12 meses e em mais de 70% dos casos os testes permaneciam alterados em um ano. A maioria dos pacientes com dano cognitivo persistente apresenta falha de memória, alteração de função executiva, déficit de atenção, na velocidade de processamento, na função intelectual e até alteração visual (Hopkins e cols.; 2009). Essas alterações tendem a melhorar ao longo do tempo, porém estudo

com acompanhamento superior a seis anos mostrou que esse déficit pode ser permanente (Rothenhausler e cols.; 2001).

O diagnóstico da EAS é principalmente clínico e de exclusão. A tomografia computadorizada costuma ser normal. O eletroencefalograma (EEG) mostra lentificação e diminuição principalmente da onda alfa e essas alterações estão relacionadas a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral medido nas primeiras 24h após a indução de endotoxemia por LPS em ratos Wistar (Semmler e cols.; 2008). O EEG pode mostrar alterações mesmo antes de sintomas clínicos aparecerem (Wilson e cols., 2003). É um exame de alta sensibilidade, porém de baixíssima especificidade (Semmler e cols., 2008), tornando seu uso à beira do leito bastante limitado.

O exame clínico e teste específicos para avaliação de delirium são as principais ferramentas para o diagnóstico. O método ouro é a aplicação do Manual de Diagnóstico e Estatística para Distúrbios Mentais (DSM) IV. Este método é especificamente sensível para pacientes hospitalizados e com doença aguda (Laurila e cols.; 2004). No entanto, a sua aplicação exige treinamento extenso, conhecimento profundo do manual e tempo que nem sempre está disponível na rotina das UTI. A fim de facilitar esse diagnóstico, outros testes como o CAM (Confusion Assessment Method; Inouye e cols.; 1990) ganharam importância. Neste teste cinco critérios são utilizados para o diagnóstico de delirium. São avaliados a instalação aguda, a característica flutuante, a falta de atenção, o pensamento desorganizado e o nível de consciência alterado.

Nem sempre a avaliação clínica e aplicação de testes para diagnóstico de delirium são possíveis no ambiente de terapia intensiva, pois grande parte dos pacientes sépticos, principalmente os mais graves, encontra-se sedados. Protocolos de interrupção diária de sedação podem favorecer essa avaliação além de diminuir o tempo de ventilação mecânica e de internação em terapia intensiva (Kress e cols.; 2000).

O uso de imagens de ressonância magnética (RMN) evidenciou mudanças estruturais no cérebro de pacientes sépticos. Edema vasogênico e citotóxico e ruptura da barreira hematoencefálica podem ser observados na RMN de suínos sépticos (Bozza e cols., 2009). Em humanos a RMN mostra acometimento principalmente de substância branca e sugere lesão na barreira hematoencefálica. A lesão é progressiva e a quantidade de leucoencefalopatia parece estar diretamente relacionada com a gravidade do choque e com pior prognóstico (Sharshar e cols., 2007). Especificamente em pacientes com sepse e disfunção pulmonar, a RMN mostra alterações em 53% dos pacientes incluindo atrofia cerebral e aumento ventricular (Hopkins e cols.; 2006).

A análise de necropsia do córtex de 23 pacientes que morreram de choque séptico realizada por Sharshar e colaboradores (2004) mostrou que o dano cerebral é difuso e está relacionado a apoptose do centro autonômico neuronal. Hemorragia ocorreu em 26% e micro-abscessos em 9%, leucoencefalopatia multifocal necrotizante em 9% e isquemia em 100% dos cérebros analisados. Isquemia também estava presente nos outros grupos de pacientes de terapia intensiva incluídos no estudo, no entanto, nos pacientes que faleceram de choque séptico, a isquemia é mais evidente nos centros autonômicos.

Durante muito tempo o conceito de “privilégio imune” foi atribuído ao cérebro. Acreditava-se que o cérebro não seria acometido e nem contribuiria para a resposta inflamatória. Hoje, sabemos que isso não é verdade e que o cérebro apresenta sinais clássicos de inflamação, bem parecido em alguns aspectos com o que observamos em outros órgãos (Flierl e cols.; 2010). O aumento da permeabilidade vascular permite a passagem de mediadores inflamatórios e interação com células do sistema nervoso central (SNC). O SNC não é só suscetível, mas contribuidor ativo na resposta inflamatória. As células do SNC percebem insultos periféricos e rapidamente, em até 30 minutos, e podem gerar mudanças neuroendócrinas. Como em outros tecidos, há liberação de citocinas, radicais livres e ativação do complemento que agem localmente causando sintomas neurológicos e a distância perpetuando a resposta inflamatória (Lucas e cols., 2006).

O cérebro possui maior taxa de consumo de O₂ por grama de tecido e dispõe de poucas defesas antioxidantes. Essa característica o torna bastante suscetível durante sepse. O aumento de marcadores específicos de injúria cerebral, como enolase neurônio específica e a proteína S-100 β ocorre na maioria dos pacientes com EAS (Lacombe e cols., 2009). S-100 β está relacionada com a extensão da injúria cerebral. Valores acima de 4 μ g/dl estão relacionados a isquemia e hemorragia visto em tomografia, enquanto valores 1-2 μ g/dl estão associados a infartos microembólicos na ressonância magnética. O aumento da S-100 β tem associação direta com a alta mortalidade e é um preditor independente de sobrevida na terapia intensiva (Lacombe e cols., 2009).

TLR estão presentes na microglia, astrócitos e oligodendrócitos. A resposta inflamatória parece ocorrer de maneira semelhante a outros órgãos (Wilson e cols., 2003). Citocinas pró inflamatórias como IL6, IL1 β e TNF α encontram-se aumentadas na EAS e estimulam a produção de NO induzida pela oxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Wilson e cols., 2003). NO é um fator importante para a autoregulação cerebral, é capaz de reagir com fatores oxidantes, induzir a produção de peroxinitrito e interferir na cadeia respiratória mitocondrial (Andersen e cols., 2004).

Há uma ineficiência no metabolismo mitocondrial com mudança no potencial de membrana e aumento do consumo de oxigênio não relacionado a síntese de ATP (Dávila e cols., 2008). Este aumento no consumo de oxigênio pode estar relacionado ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação da cascata de apoptose (Merenda e cols., 2006). Dano oxidativo ocorre nas primeiras 6 h no cérebro de animais sépticos e isso está diretamente relacionado a um desequilíbrio de enzimas antioxidantes (Barichello e cols., 2006).

A maneira como essas alterações agudas resultam em dano cognitivo a longo prazo é desconhecida. Uma sugestão de fatores envolvidos está representado na figura 1.3. O tempo de hipóxia, choque e delirium dentro da terapia intensiva parecem ser fatores relevantes. Idosos, que são aproximadamente 60% da população em terapia intensiva são mais suscetíveis e apresentam mais comorbidades como doença neurovascular que está associada a alteração neurocognitiva. A permanência em terapia intensiva é fator desencadeante e acelerador de demência (Hopkins e cols.; 2010).

Não há tratamento específico para o EAS. Diminuir o tempo de hipoxemia e choque com terapias de suporte e reposição volêmica nas primeiras 6h pode diminuir a SDOM (Bozza e cols.; 2010). O uso de dotrecogina alfa (ativada) é capaz de atenuar EAS severa e a evolução de pacientes graves (Spapen e cols.; 2010). Muitos pacientes necessitam de terapia de reabilitação e tem a qualidade de vida bastante prejudicada após uma única internação em terapia intensiva.

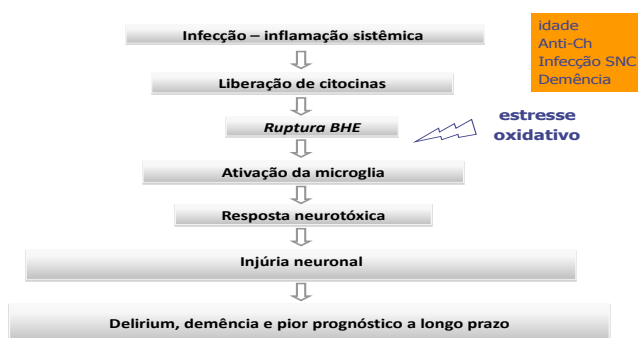


Figura 1.3: Fatores envolvidos na fisiopatologia da encefalopatia associada à sepse. BHE, barreira hematoencefálica; SNC, sistema nervoso central.

1.5 Modelos Experimentais

A complexidade da sepse faz com que estudos clínicos e terapêuticos em humanos sejam de difícil realização. Modelos animais foram desenvolvidos a fim de criar situações semelhantes a prática clínica propiciando o estudo da fisiopatologia e tratamento da sepse. Modelos animais são de fácil reprodução e podem ser usados em testes preliminares de

agentes terapêuticos. No entanto, quando se faz uma revisão de terapias propostas a partir de testes em modelos experimentais vemos que menos do que 10% resulta na aprovação de tratamento clínico (Marshall e cols., 2005). A condição humana de choque e sepse é extremamente heterogênea e a sua tradução para um modelo experimental requer que se leve em consideração não só o insulto desencadeador, mas também as intervenções e comorbidades envolvidas. Não existe um modelo animal ideal que consiga reproduzir fielmente a sepse, o que não significa que os modelos experimentais devam ser abandonados, mas sim aperfeiçoados.

Um fator interessante do modelo experimental é como uma mesma intervenção pode causar resultados distintos dependendo do modelo usado. Nenhum modelo experimental pode fornecer dados definitivos sobre a eficácia de um determinado tratamento. Parece interessante a idéia de que uma única terapia seja testada em diversos modelos e em diferentes condições experimentais. Vale a pena lembrar que na maioria das vezes o modelo é realizado em animais jovens e previamente saudáveis o que difere bastante do que encontramos na prática clínica.

O modelo de punção e ligadura do ceco (CLP) vem sendo usado há mais de 25 anos (Wichterman e cols.; 1980) e é considerado atualmente o modelo ouro para estudo da sepse. O animal é anestesiado e submetido a um procedimento cirúrgico. O ceco é exposto, ligado e perfurado causando uma sepse abdominal polimicrobiana e produzindo um quadro infeccioso agudo com toxicidade do hospedeiro (Hubbard e cols., 2005). A gravidade do modelo é controlada pelo número e pelo tamanho das perfurações realizadas no ceco. Reposição volêmica e antibiótico podem ser usados nesse modelo e reduzem a mortalidade em 50-75% (Deitch; 2005). Desta forma pode-se adaptar o modelo para uma morte em poucas horas ou mais tardia.

O modelo CLP leva alterações hemodinâmicas e metabólicas. Observa-se uma resposta inflamatória, aumento na produção de citocinas, presença de apoptose e resposta imune semelhantes à encontrada em seres humanos (Remick e cols., 2005). A grande desvantagem do modelo é a sua reprodutibilidade. A técnica permite grande variabilidade e os resultados podem ser diferentes dependendo do treinamento técnico de quem executa o procedimento.

Outro modelo de sepse abdominal polimicrobiana é a peritonite por stent em cólon ascendente (CASP). É em procedimento cirúrgico e necessita do uso de anestésicos. Um stent é colocado no cólon ascendente permitindo a comunicação do interior da alça com o peritônio. Há extravasamento de fezes e a gravidade pode ser controlada pelo diâmetro do stent (Deitch e cols., 2005). Este modelo permite o uso de reposição volêmica e antibiótico,

mas a sua técnica de execução é ainda mais complexa do que o CLP sendo um modelo pouco utilizado.

O uso de anestésico, necessário nesses modelos cirúrgicos, pode trazer efeitos colaterais significativos. Os anestésicos inalatórios podem causar alterações cardiovasculares, opióides e benzodiazepínicos podem ser antiinflamatórios (Dyson e cols., 2009). Existe uma associação relevante entre o uso de sedativos e o desenvolvimento de delirium (Kress; 2010). Mesmo o uso intermitente dessas drogas pode trazer malefícios e há relação entre a anestesia e o desenvolvimento de delirium no pós operatório (Heymann A e col.; 2010).

Outra maneira de desencadear sepse no animal é usando modelos de endotoxemia. Neles, uma toxina exógena é administrada para simular no animal as mudanças fisiopatológicas que ocorrem durante a sepse (Buras e cols., 2005). Toxinas podem ter diversas vias de administração: intravenoso, intra-abdominal e traqueal são alguns exemplos. A toxina mais comumente usada é o lipopolissacarídeo (LPS). O LPS faz parte da membrana de bactérias gram negativas, se liga ao TLR e é capaz de desencadear a resposta inflamatória da sepse.

Apesar da facilidade técnica e pouca variabilidade, o modelo de administração de toxina não parece reproduzir toda a complexidade da sepse. A administração de toxina intra-abdominal tem grande semelhança ao CLP quando analisado mortalidade, alterações motoras e hematológicas. No entanto o aumento de citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6 é pontual e transitório, enquanto no CLP, assim como no humano, o aumento de citocinas se sustenta por um tempo mais prolongado (Dyson e cols., 2009).

Tentando manter o conceito de facilidade técnica e pouca variabilidade, a inoculação de bactérias por diferentes vias (intravenoso, intra-abdominal e instilação traqueal), parece ser uma alternativa interessante, uma vez que não se trata apenas da administração da toxina, mas da bactéria íntegra. A instilação traqueal parece ter bons resultados em reproduzir a sepse pulmonar. Porém, quando administrada via intravenosa ou intra-abdominal a bactéria inoculada não parece capaz de se multiplicar desencadeando um processo infeccioso. Em vez disso, a bactéria deflagra apenas uma resposta inflamatória transitória, é rapidamente fagocitada, e o resultado é um modelo parecido com a inoculação de LPS (Dyson e cols., 2009).

A injeção de fezes intraperitoneal é um modelo que se assemelha ao modelo CLP por produzir sepse polimicrobiana, porém sem precisar do uso de anestésicos ou de procedimento cirúrgico. É um modelo pouco utilizado por haver relatos de causar sepse rapidamente, levando a morte ou recuperação do animal em pouco tempo (Rittirsch e cols., 2007), seguindo o padrão do modelo de endotoxemia. No entanto, um estudo mostrou que com o uso de

reposição volêmica e antibiótico, o modelo de injeção de fezes é capaz produzir peritonite e sepse com características semelhantes a do ser humano, inclusive com disfunção orgânica múltipla e mitocondrial (Breadley e cols., 2004).

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta tese é padronizar um modelo de sepse peritoneal em murinos e caracterizar a resposta inflamatória e disfunção orgânica múltipla neste modelo. A partir do modelo padronizado deu-se ênfase no estudo da EAS com caracterização de alterações comportamentais, inflamatórias metabólicas e oxidativas.

2.2 Objetivo específico

- Analisar sobrevida em modelo de injeção de fezes intraperitoneal.
- Caracterizar o padrão da resposta inflamatória através de análise de biomarcadores e de celularidade total e específica no sangue e peritônio.
- Caracterizar a disfunção orgânica no modelo a partir da análise de bioquímica plasmática.

- Caracterizar o dano cognitivo em animais que sobrevivem a sepse.
- Verificar a disfunção mitocondrial cerebral em modelo de sepse peritoneal
- Avaliar as alterações na captação de glicose cerebral de animais sépticos.
- Caracterizar o dano oxidativo no cérebro de animais sépticos.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Para realização deste estudo foram utilizados 240 camundongos Swiss. Todos os parâmetros foram avaliados 6 e 24 h após a indução da sepse com exceção do dano cognitivo, experimento realizado nos animais que sobreviveram à sepse após 10 dias. Os mesmos protocolos foram realizados para os animais controle. Após 6 h da indução da sepse 10 animais foram usados para medida de pressão arterial e coleta de sangue da cauda. 60 animais foram eutanasiados para avaliação de bioquímica, citocinas plasmáticas e em líquido peritoneal, celularidade total e diferencial no sangue e no líquido peritoneal, e disfunção cerebral (consumo de oxigênio mitocondrial, captação de glicose, produção de TBARS e de citocinas no cérebro). O restante dos animais recebeu antibiótico Imipenem 10mg/kg diluído em salina 0,2ml via subcutânea. Desses animais, 30 foram observados quanto a mortalidade, 10 usados para medida de pressão artéria e coleta de sangue da cauda, 60 foram eutanasiados em 24 h para as mesmas análises realizadas com os animais em 6 h e 32 animais foram avaliados no décimo dia quanto ao dano cognitivo (figura 3.1).

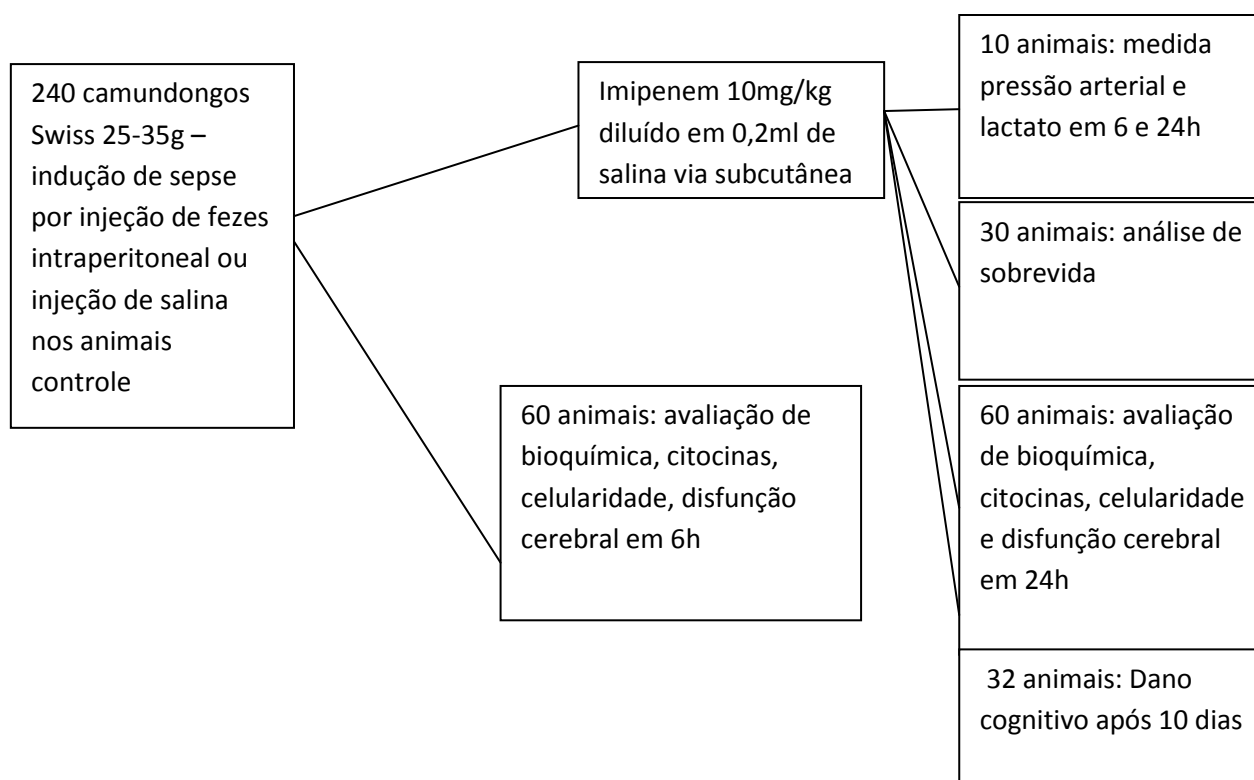


Figura 3.1: Desenho experimental. Foram utilizados 240 camundongos Swiss. 60 eutanasiados para análise em 6 horas. O restante recebeu antibiótico imipenem . Desses, 30 foram observados quanto a mortalidade, 10 tiveram a pressão arterial aferida e sangue colhido da cauda, 60 foram eutanasiados em 24h para as mesmas análises realizadas em 6 horas, e 32 avaliados quanto ao dano cognitivo em 10 dias

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando 25-35g provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ. Durante a permanência dos animais em nosso biotério, estes foram mantidos em temperatura constante (25°C), com ciclo de 12h claro/escuro e livre acesso de água e comida.

3.3 Preparo e injeção de fezes

As fezes foram recolhidas do intestino grosso de camundongos Swiss que foram submetidos à eutanásia em câmara com atmosfera rica em CO₂. Cada animal foi capaz de fornecer em torno de 1g de fezes. Foram adicionadas às fezes solução salina estéril para que fosse obtido uma dose de 5mg de fezes para cada 1 grama de peso do animal, chegando ao máximo de 150mg de fezes diluídas em 0,5ml de salina estéril. O material foi centrifugado a 800rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi usado para injeção por via intraperitoneal. Após seis horas os animais receberam 10mg/kg de antibiótico Imipenem diluído em 0,2ml de salina via subcutânea. Os animais controles receberam 0,5ml de salina estéril por via intraperitoneal e seis horas após, receberam antibioticoterapia.

3.4 Medida da pressão arterial

A medida da pressão arterial foi obtida por sistema computadorizado, não invasivo de pressão pela cauda (BP 2000 Visitech System, Apex, USA). Os camundongos são contidos em uma plataforma aquecida (38°C) em ambiente tranquilo. Uma vez contidos na caixa própria para a aferição da pressão arterial, os animais permaneceram por 10 minutos para que se acalmem e se ambientem. Cinco medidas consecutivas foram realizadas como teste para que o animal se acostumassem com o procedimento, seguidas de 10 medidas consecutivas para avaliação.

3.5 Análise de Lactato

Para análise de lactato, o sangue foi coletado da cauda de 5 animais antes da indução da sepse, bem como 6 e 24 horas após a indução de sepse. Aferições foram realizadas com aparelho "Lactate Accutrend da Roche, Mannheim, Germany".

3.6 Análise de celularidade total e diferencial

Para a análise de celularidade sanguínea total e diferencial, o sangue foi colhido da cauda dos animais, 6 e 24 horas após a indução de sepse. O número de leucócitos totais foi obtido por contagem em câmaras de Neubauer, sob microscópio óptico, após diluição das amostras em solução de Türk (2% de ácido acético). Para contagem diferencial dos leucócitos no sangue, foram feitos esfregaços, corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa, para posterior análise sob microscópio ótico em objetiva de imersão em óleo (100x).

Para a análise da celularidade no lavado peritoneal dos animais, 6 e 24 horas após a indução de sepse, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara com atmosfera rica em CO₂ e o fluido peritoneal foi obtido através da lavagem com 3ml de PBS (1x). Após a obtenção do lavado peritoneal, a contagem total de leucócitos do lavado peritoneal foi efetuada em câmaras de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 100x), após diluição (40x) das mesmas em solução de Türk. A análise diferencial de leucócitos foi realizada sob objetiva de imersão em citoesfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin 3 Shandon, Nutley, USA) – 450 rpm por 5 minutos, corados pelo método May Grünwald-Giemsa. De acordo com este método, as lâminas ficam imersas no May Grünwald por 3 minutos para fixação, 2 minutos em água para retirada do excesso de corante e 15 minutos no Giemsa, para coloração. Foram contadas 100 células consecutivas por citoesfregaço. A quantificação de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células.

3.7 Análises bioquímica

Para análise de bioquímica o sangue foi coletado por punção cardíaca, 6 e 24 h após a indução de sepse, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara com atmosfera rica em CO₂. Imediatamente após a eutanásia, os animais tiveram a cavidade torácica aberta e o sangue coletado através de punção cardíaca por visualização direta e punção do ventrículo esquerdo, com o auxílio de uma seringa de 1ml e agulha 27G. O plasma foi obtido através da centrifugação (8000rpm/5 minutos) do sangue total. A análise bioquímica: uréia, creatinina, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e alanina aminotransferase (TGP) foram

realizadas utilizando o plasma sanguíneo no equipamento Vitros 250 Ortho Clinical Diagnostics, da Johnson & Johnson, Rochester, USA.

3.8 Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas e quimiocinas presentes no sangue obtido por punção cardíaca e no lavado peritoneal dos animais, foram quantificadas pelo método de ELISA (Duo set Kit da R&D systems). O ELISA foi realizado em três dias consecutivos. No primeiro dia foi aplicado 50ul do anticorpo de captura correspondente a cada citocina ou quimiocina por poço em placa de 96 poços. No segundo dia, os poços foram lavados com PBS/tween a 0,05%, para remoção dos anticorpos não aderentes à superfície da placa. Esse procedimento é seguido do bloqueio com PBS com 2% Soro de Albumina Bovina (BSA) por cerca de uma hora. O bloqueio é realizado para evitar que ocorram ligações inespecíficas. Após o bloqueio a placa foi lavada novamente por três vezes com PBS/tween a 0,05% e então foram aplicadas as amostras a serem analisadas e o anticorpo recombinante das citocinas e quimiocina analisadas, diluído de forma seriada em cada poço da placa de 96 poços. No dia seguinte, a placa foi lavada por quatro vezes com PBS/tween a 0,05% e, posteriormente, foi aplicado o anticorpo de detecção correspondente as citocinas e a quimiocina analisadas biotilado da BD pharmingen. Após 1 hora a placa foi lavada seis vezes com PBS tween a 0,05%, e aplicamos a estreptavidina conjugada à peroxidase, que se liga à biotina. Meia hora após a placa foi lavada 8 vezes com PBS/tween a 0,05%, e foi colocada a solução de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) da sigma, que é o substrato da peroxidase (3º dia do ELISA). Ocorre uma reação que gera uma coloração azul que pode ser lida no comprimento de onda de 370 ou 655nm. No entanto, nós utilizamos uma solução de parada com ácido sulfúrico a 12 N, que foi lida no comprimento de onda de 450 nm em leitora de microplacas e os dados foram analisados utilizando o programa Softmax Pro 5.

3.9 Análise microbiológica

Amostras do sobrenadante das fezes centrifugada foram enviadas para análise no laboratório de microbiologia para identificação de bactérias e teste de resistência a antibiótico. Culturas foram realizadas em placas de ágar sangue, ágar chocolate e ágar McConkey.

3.10 Obtenção de cortes de cérebro

Para avaliação cerebral os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. A calota craniana foi aberta e o cérebro exposto. O cérebro foi retirado e mantido em tampão de preservação (90mM NaCl, 3mM KCl, 2mM MgSO₄, 2mM CaCl₂, 10mM glicose, 105mM

sucarose e 10mM ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-2-etilsulfônico (HEPES-NaOH); pH=7,4) e gelo. Imediatamente as estruturas cerebrais foram separadas em cerebelo, córtex direito e esquerdo. O córtex direito foi colocado em chooper (Ted Pella Inc., McIlwain Tissue Chopper, Redding, USA) e cortes de 400µm foram obtidas. Os cortes foram mantidos em tampão de preservação e gelo até o momento do experimento.

3.11 Dano cognitivo - Teste "open field"

Em uma caixa de madeira (40 x 60 x 50 cm) com piso dividido em 12 quadrados iguais, os animais, na sessão de treino, foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual exploraram livremente o ambiente por 5 minutos. Após 24 horas, a sessão de teste foi realizada como descrito para o treino. Em ambas as sessões foram avaliados o número de cruzamentos através das linhas pretas e de “rearings” (quando o animal se sustenta em apenas duas patas traseiras). O teste foi realizado com 20 animais controle e 12 animais que sobreviveram a sepse. A sessão de treino ocorreu 10 dias após a indução da sepse e o teste no décimo primeiro dia.

3.12 Captação de glicose

A captação de glicose foi monitorada através de um análogo fluorescente, o 6-NBDG (6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-6-deoxyglucose). Cortes do córtex cerebral foram mantidas em tampão de preservação resfriado a 4°C. Para a captação de 6-NBDG as fatias foram colocadas em 500µl de tampão de respiração suplementado com 5mM de glicose e 100 µM de 6-NBDG e incubadas por trinta minutos a 37°C. Após este período os tecidos foram lavados três vezes em tampão de respiração para retirar o NBDG não captado. Em seguida o material era homogeneizado e sonificado em banho maria por 6 minutos. As amostras foram diluídas dez vezes e 200µL foram adicionados numa placa para a leitura no fluorímetro (Molecular devices Inc., SpectraMax M5, Sunnyvale, USA) nos comprimentos de emissão e excitação de 540nm e 465nm, respectivamente. Os resultados representam a diferença de fluorescência entre os tecidos mantidos a 37°C e 0°C (controle de negativo para a captação de 6-NBDG). O mesmo protocolo foi realizado em animais controles, 6 e 24h após a indução de sepse.

3.13 Consumo de oxigênio

Para avaliação do consumo de oxigênio, foi usado oxígrafo (Hansatech Instruments, Norfolk, England). Cortes de 400µm do córtex junto com tampão de respiração (125mM NaCl, 3mM KCl, 2mM CaCl₂, 1,25mM fosfato de sódio, 2mM MgCl₂ e 20mM HEPES-

NaOH, pH7,4) foram colocados na cubeta do oxígrafo para análise. A temperatura da cubeta foi estabelecida em 27°C. Foi adicionado glicose 0,1M 5µl. Após estabilização do traçado foi titulado a dose de oligomicina adicionando oligomicina 0,1mg/ml (2µl) cinco vezes e seguido de oligomicina 1mg/dl (1µl). Sempre, entre uma adição e outra, esperava-se a estabilização do traçado. No final foi realizado a titulação da dose de carbonil cianeto p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) com adição de FCCP 0,2mM (3µl) duas vezes e depois mais (2µl). O mesmo protocolo foi realizado para animais controle e 6 e 24 horas após a indução da sepse.

3.14 Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para dosagem de TBARS o cérebro dos animais foi separado em 5 estruturas: pré-frontal, hipocampo, estriado, córtex e cerebelo. As estruturas foram colocadas em criotubos contendo 1ml PBS acrescido de BHT (0,2% em etanol). O tecido foi homogeneizado e quantificou-se a proteína pelo método de BCA. A uma solução contendo 50 µg de proteína adicionou-se 500µl da solução TBA 0,67% (solução 1:1 água e ácido acético). Os tubos foram colocados em banho seco a 96°C durante 30 minutos. A reação foi parada em gelo, o material foi então transferido para uma placa de 96 poços (200µl), seguido pela leitura em espectrofotômetro a 535nm. Para determinação da quantidade de TBARS foi utilizado o coeficiente de extinção molar ($A=l.\epsilon.C$ $-1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, onde A-absorvância, l-comprimento de onda, ϵ -coeficiente de extinção molar e C- concentração de MDA). Os resultados foram expressos em concentração por miligrama de proteína.

3.15 Análise Estatística

Todos os dados são apresentados em média +/- erro padrão. Dados foram analisados por ANOVA two way quando comparados vários grupos e test t quando comparados apenas dois grupos. Foi realizado o teste de normalidade (Kolmogorov) para aplicação de teste t (distribuição normal) ou não paramétrico. O software utilizado foi o prism 4.

4.0 RESULTADOS

4.1 Análise de sobrevivida

Vinte animais sépticos e dez controles foram acompanhados por 144 horas após a indução de sepse por injeção de fezes intraperitoneal (dose de 5mg de fezes por grama de peso do animal) seguido da administração de antibiótico imipenem (10mg/kg) 6h após. Esta mesma dose de fezes e antibiótico foi utilizada em todos os experimentos. Não houve óbito entre os dez animais controles que receberam injeção intraperitoneal de salina e antibiótico imipenem 6h depois. Entre os animais sépticos observamos que 10% dos animais morrem nas primeiras 12 horas, cerca de 50% até 24h, e em torno de 60% até as primeiras 48 horas. Não foi observado nenhum óbito após 48 horas. (Figura 4.1).

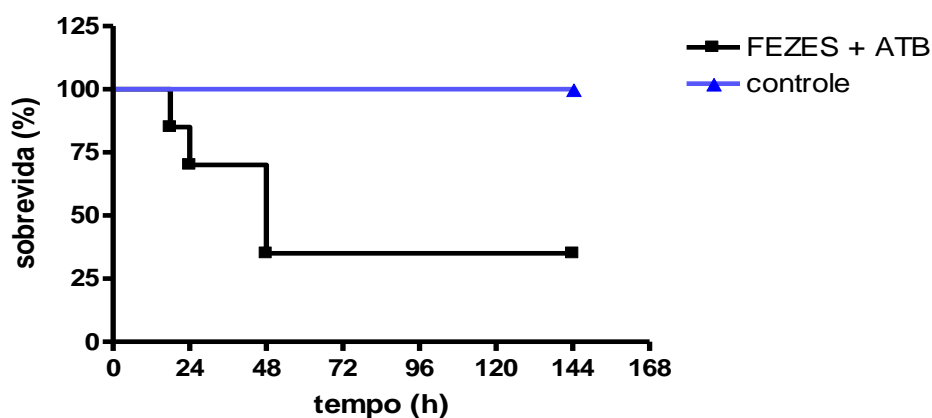


Figura 4.1: Análise de sobrevivida. Sobrevivida em 144 horas de camundongos Swiss submetidos a injeção intraperitoneal de fezes e antibiótico imipenem 6h após. N=20. Controle recebeu salina intraperitoneal e imipenem 6h após. N=10.

4.2 Análise clínica e metabólica

Para análise da pressão arterial foram usados 10 animais normais. Esses mesmos animais foram submetidos a injeção de fezes intraperitoneal. Após 6h a pressão arterial dos animais sobreviventes (n=8) foi aferida. Podemos observar uma queda na média da pressão arterial sistólica de 101,2 mmHg (+/-2,8) para 67,13 mmHg (+/- 20,78). Nesse momento não foi possível aferir a pressão de três animais que se encontravam em hipotensão severa. Os animais receberam antibiótico imipenem. No tempo de 24h a pressão arterial dos sobreviventes (n=6) foi novamente aferida. A média da pressão arterial sistólica foi de 82,17 mmHg (+/-8,9) ($p < 0,05$) (figura 4.2).

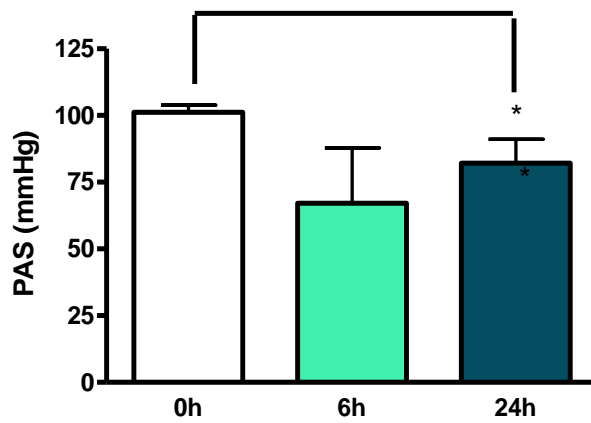


Figura 4.2: Medida da pressão arterial sistólica em animais sépticos. A pressão arterial foi aferida antes (n=10), 6h (n=8) e 24h (n=6) após os animais serem submetidos a injeção intraperitoneal de fezes e injeção de antibiótico imipenem 6h depois. * p<0,05.

A hipoperfusão periférica pode ser documentada a partir da dosagem do lactato sérico. Nesse caso, os animais controle (n=5) receberam solução salina intraperitoneal seguido da administração de antibiótico imipenem 6h depois. Os animais sépticos (n=5) foram submetidos a injeção intraperitoneal de fezes seguido de antibiótico imipenem 6h depois. Houve aumento significativo no lactato se comparados os animais controle (3,62 +/- 0,13 mmol/L) com 6h (4,86 +/-0,14mmol/L p<0,01) e com 24h (4,8 +/-0,55mmol/L p<0,01) de sepse (figura 4.3)

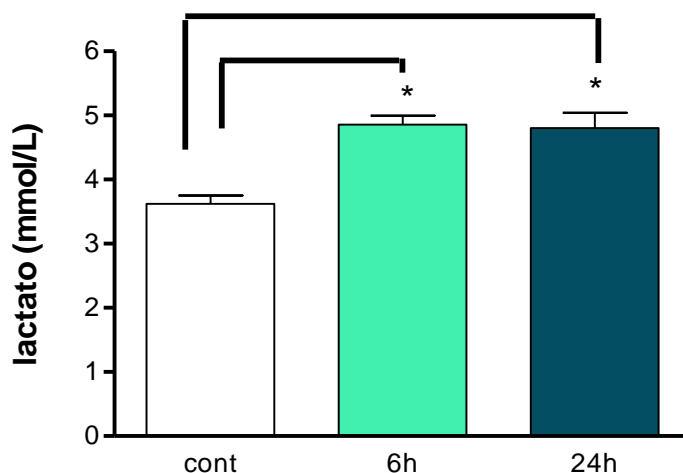


Figura 4.3: Dosagem de lactato sérico. A dosagem de lactato foi realizada em animais controle (n=5) (salina 0,5ml + imipenem 10mg/kg após 6h) no tempo de 24h e em animais sépticos (injeção intraperitoneal de fezes 5mg/grama de peso do animal + imipenem 10mg/kg após 6h) nos tempos de 6 (n=5) e 24h (n=5). *p<0.01.

4.3 Análise Bioquímica

Disfunção renal e hepática foi documentada através de bioquímica plasmática. Animais controle (n=4) receberam injeção de salina intraperitoneal seguido de antibiótico imipenem 6h depois. Os sépticos (n=8) foram submetidos a injeção de fezes intraperitoneal seguido de antibiótico imipenem 6h depois. Insuficiência renal foi caracterizado pelo aumento de uréia e creatinina séricas em 24h. A média da uréia dos animais controle foi de 51,78mg/dl (+/-3,41) e em 24h de sepse 86,78mg/dl (+/-21,08). A creatinina aumentou de 0,28mg/dl (+/-0,3) nos animais controle para 0,79mg/dl (+/-0,13 p<0,01) em 24h de sepse (p<0,01)(figura 4.4).

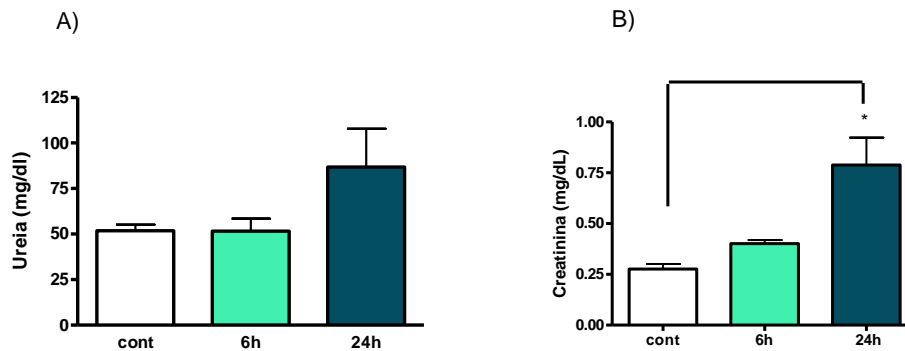


Figura 4.4: Avaliação da disfunção renal em animais sépticos. Dosagem da uréia (A) e cratinina (B) foi realizada em animais controle (n=5) (salina 0,5ml + imipenem 10mg/kg após 6h) no tempo de 24h e em animais sépticos (injeção intraperitoneal de fezes 5mg/grama de peso do animal + imipenem 10mg/kg após 6h) nos tempos de 6 (n=8) e 24h (n=8). *p<0,01.

A função hepática foi avaliada a partir da dosagem das enzimas TGO e TGP. A média da TGO nos animais controle foi de 248,5U/L (+/-155,3). Em 6h houve aumento para 928,8U/L (+/-248) e em 24h a média foi de 1302U/L (+/-544,9 p<0,05) nos animais sépticos. TGP aumentou de 38U/L (+/-1,4) nos animais controle para 131,4U/L (+/-46,9 p<0,05) em 6h e para 265U/L (+/-160 p<0,05) em 24h nos animais sépticos (Figura 4.5).

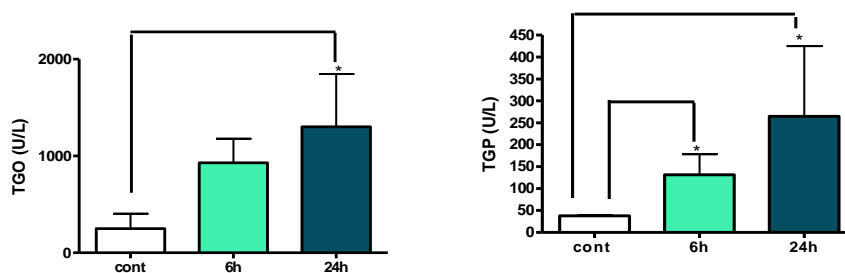


Figura 4.5: Avaliação da disfunção hepática em animais sépticos. Dosagem de TGO(A) e TGP (B) sérica foi realizada em animais controle (n=4) (salina 0,5ml + imipenem 10mg/kg após 6h) no tempo de 24h e em animais sépticos (injeção intraperitoneal de fezes 5mg/grama de peso do animal + imipenem 10mg/kg após 6h) nos tempos de 6 (n=8) e 24h (n=8). *p<0,05.

4.4 Dosagem de citocinas

A resposta inflamatória do modelo foi medida a partir do aumento de citocinas no sangue e líquido peritoneal. Animais controle (n=4) receberam solução salina intraperitoneal seguido da administração de antibiótico imipenem 6h depois. Os animais sépticos 6h (n=8) foram submetidos a injeção intraperitoneal de fezes e os analisados em 24h receberam antibiótico imipenem 6h depois da injeção de fezes intraperitoneal. A análise do sangue revelou que em 6h houve aumento significativo dos níveis plasmáticos de IL-6: 789pg/ml (+/-95) em relação ao controle 22pg/ml (+/-9, p<0,01); IL 1 β : 80pg/ml (+/-17) em relação ao controle 20pg/ml (+/-15 p<0.01) e MIP-1 α 63pg/ml (+/-29) em relação ao controle 0,0 (p<0,01). Em 24h o aumento mais importante foi o de MIP-1 α : 52pg/ml (+/-17)no plasma em relação ao controle 0 (p<0,01) (Figura 4.6).

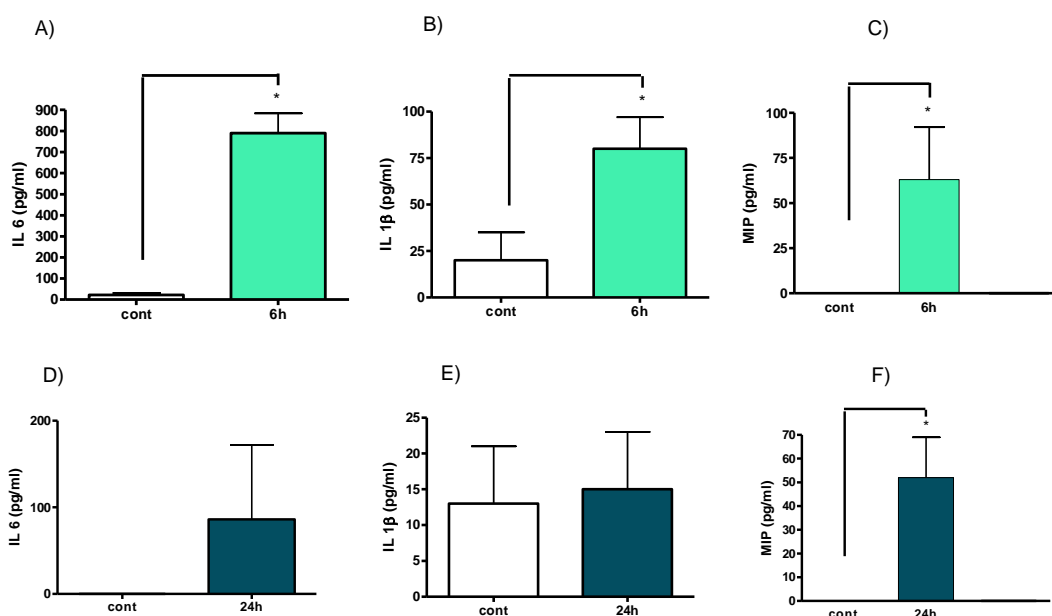


Figura 4.6: Concentração de citocinas no plasma em animais sépticos. Dosagem de IL 6 (A e D) IL 1 β (B e E) e MIP 1 α (C e F) no foi realizada no plasma em animais controle (n=4) (salina 0,5ml + imipenem 10mg/kg após 6h) no tempo de 24h e em animais sépticos (injeção intraperitoneal de fezes 5mg/grama de peso do animal + imipenem 10mg/kg após 6h) nos tempos de 6 (n=8) e 24h (n=8). *p<0,03.

A análise do líquido peritoneal mostrou aumento de IL-6 e MIP-1 α em 6h e 24h. IL-6 aumentou de 210pg/ml (+/-1) no grupo controle para 879pg/ml (+/-14) em 6h (p<0,01). MIP-1 α aumentou de 10pg/ml (+/-0) no grupo controle para 306pg/ml (+/-37) em 6h (p<0,01). Na análise de 24h a IL-6 e MIP-1 α subiram de valores indetectáveis para 90pg/ml (+/-70 p<0,05) e 126pg/ml (+/-6 p<0,01) respectivamente (Figura 4.7).

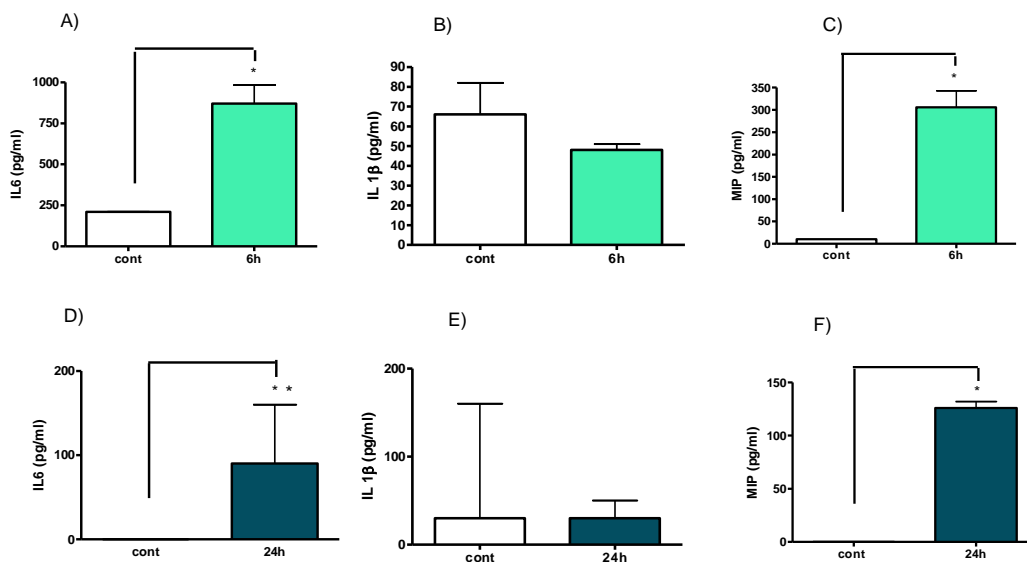


Figura 4.7: Concentração de citocinas no líquido peritoneal em animais sépticos. Dosagem de IL 6 (A e D), IL 1 β (B e E) e MIP 1 α (C e F) no peritônio foi realizada em animais controle (n=4) (salina 0,5ml + imipenem 10mg/kg após 6h) no tempo de 24h e em animais sépticos (injeção intraperitoneal de fezes 5mg/grama de peso do animal + imipenem 10mg/kg após 6h) nos tempos de 6 (n=8) e 24h (n=8). *p<0,05 (t test two tailed, não pareado).

4.5 Análise de celularidade total e diferencial

A contagem de células inflamatórias totais e diferenciais foi realizada no sangue e no líquido peritoneal. Animais controle (n=4) receberam injeção de salina intraperitoneal seguido de antibiótico imipenem 6h depois. Os sépticos (n=8) foram submetidos a injeção fezes intraperitoneal seguido de antibiótico imipenem 6h depois. No sangue, queda na contagem de células pode indicar consumo. Essa queda é mais evidente nas 6h. Leucócitos totais nos animais controle $9,59 \times 10^6$ cels (+/-1,21) é maior do que nos sépticos em 6h $2,77 \times 10^6$ cels (+/-0,47 p<0,01) e 24h $6,01 \times 10^6$ cels (+/- 1,19) O número de neutrófilos cai de $1,59 \times 10^6$ cels (+/-0,74) nos animais controle para $0,59 \times 10^6$ cels (+/-0,07) em 6h e volta a aumentar em 24h para $1,85 \times 10^6$ cels (+/-0,63). A média de mononucleares em animais controle é de $7,93 \times 10^6$ cels (+/-

0,87). Em 6h cai para $2,22 \times 10^6$ cels ($\pm 0,44$ $p < 0,01$) e em 24h volta a aumentar para $4,08 \times 10^6$ cels ($\pm 0,62$ $p < 0,03$) (figura 4.8).

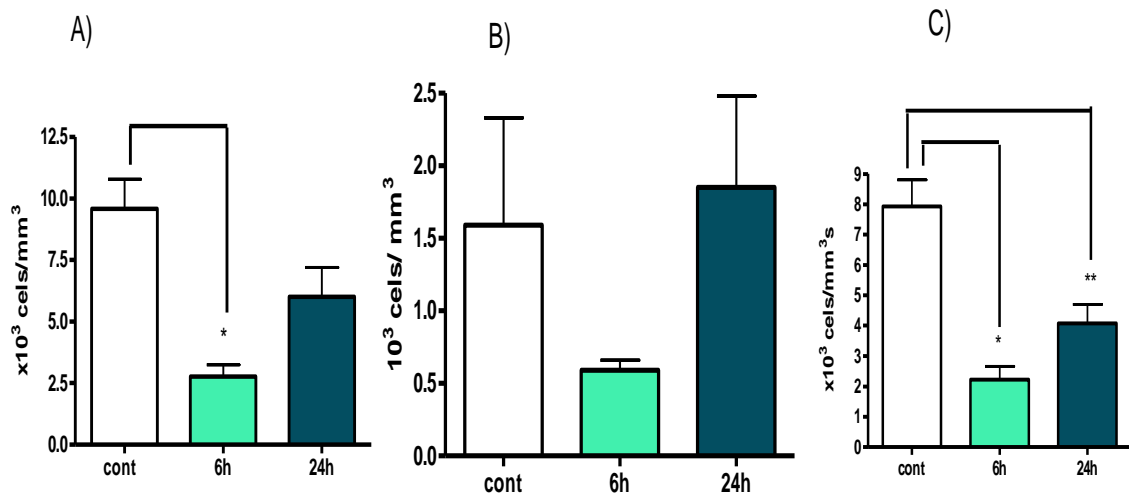


Figura 4.8: Avaliação de celularidade total e diferencial no sangue de animais sépticos. Contagem de leucócitos totais (A) neutrófilos (B) e monócitos (C) no sangue foi realizada em animais controle (n=4) (salina 0,5ml + imipenem 10mg/kg após 6h) no tempo de 24h e em animais sépticos (injeção intraperitoneal de fezes 5mg/grama de peso do animal + imipenem 10mg/kg após 6h) nos tempos de 6 (n=8) e 24h (n=8). * $p < 0,01$; ** $p < 0,03$. (t test two tail, não pareado).

O líquido peritoneal por sua vez, é pobre em células e tem predomínio de mononucleares. Na sepse, ocorre migração celular e aumento da celularidade total e de neutrófilos no líquido peritoneal que é discreta em 6h e mais acentuada em 24h. Leucócitos totais aumentam de $4,73 \times 10^6$ cels ($\pm 1,2$) nos animais controle para $19,71 \times 10^6$ cels ($\pm 5,91$ $p < 0,03$) em 24h nos animais sépticos. Neutrófilos aumentam de $0,5 \times 10^6$ cels ($\pm 0,23$) nos animais controle para $2,99 \times 10^6$ cels ($\pm 0,46$ $p < 0,01$) em 6h e $12,79 \times 10^6$ cels ($\pm 4,06$ $p < 0,05$) em 24h após a indução de sepse (Figura 4.9).

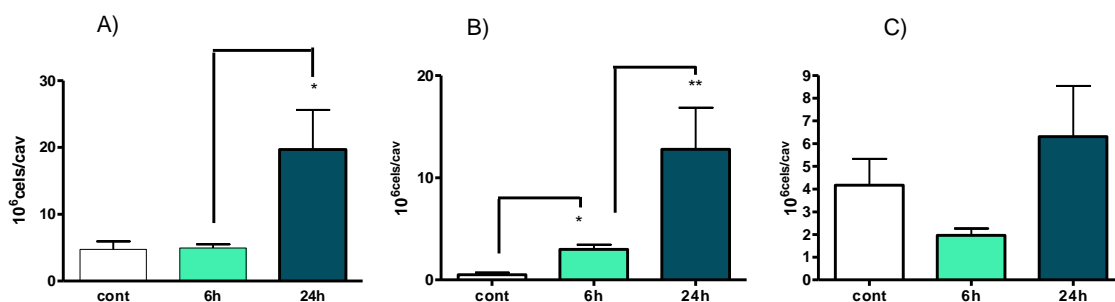


Figura 4.9: Avaliação de celularidade total e diferencial no líquido peritoneal de animais sépticos.

Contagem de leucócitos totais (A) neutrófilos (B) e monócitos (C) no líquido peritoneal foi realizada em animais controle (n=4) (salina 0,5ml + imipenem 10mg/kg após 6h) no tempo de 24h e em animais sépticos (injeção intraperitoneal de fezes 5mg/grama de peso do animal + imipenem 10mg/kg após 6h) nos tempos de 6 (n=8) e 24h (n=8). *p=0,026 B) Neutrófilos. **p=0,004; **p=0,031 (t test two tailed, não pareado) C) Monócitos. p=NS .

4.6 Análise microbiológica

A cultura do material usado para injeção intraperitoneal e indução de sepse foi cultivado em placas ágar. As seguintes bactérias foram isoladas: *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus casseliflavus*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter baumannii* / *hameolyticus*, *Escherichia coli*. Todas são sensíveis ao imipenem.

4.7 Dano cognitivo

A avaliação de dano cognitivo é realizada observando a capacidade exploratória e de memória dos camundongos. Por ser um animal curioso, o camundongo tem o reflexo de explorar a caixa utilizada. No primeiro dia é realizado um treino para que o animal possa conhecer a caixa. No dia seguinte o animal é colocado na mesma caixa e por ter capacidade de memória, explora menos o ambiente (teste). A capacidade exploratória analisada pelo número de cruzamentos e “rearings”. Os animais submetidos a sepse tem a capacidade de memória prejudicada, não reconhecem o local no treino, e exploram como no primeiro contato com a caixa. Animais controle (n=20) receberam injeção de salina intraperitoneal seguido de antibiótico imipenem 6h depois. Os sépticos (n=12) foram submetidos a injeção de fezes intraperitoneal seguido de antibiótico imipenem 6h depois. O treino foi realizado no décimo dia e o teste no décimo primeiro dia após o experimento. No animal controle, o número de cruzamento diminui significativamente de 123,16 (+/-8,39) no treino, para 87,84(+/-7,63) no teste (p<0,05). O número de rearings diminui de 38,65 (+/-2,92) no dia do treino, para 29,2 (+/-3,21) no teste (p<0,05). Não houve diferença significativa entre o número

de cruzamentos e “rearing” no treino e no teste dos animais submetidos a sepse (Figura 4.10).

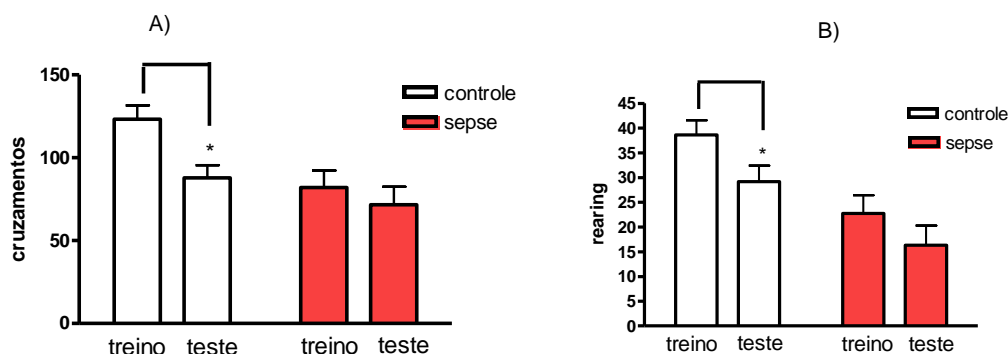


Figura 4.10: Dano cognitivo em animais que sobreviveram a sepse. Animais controle (n=20) receberam injeção de salina intraperitoneal antibiótico imipenem (10mg/kg) 6h depois. Os animais submetidos a sepse (n=12) receberam fezes intraperitoneal (5mg/grama de peso do animal) seguido de imipenem (10mg/kg) 6h depois. Medidas de cruzamentos (A) e "rearing" (B) foram realizadas após 10 (treino) e 11 dias (teste). Comparação entre teste e treino. *p<0,05.

4.6 Captação de Glicose/ consumo de oxigênio

A captação de glicose no córtex é monitorada por um análogo fluorescente, 6-NBDG. Tanto em 6h quanto em 24h, há aumento da captação de glicose. Para esta avaliação foram utilizadas fatias de córtex cerebral. No experimento de 6h os animais controle (n=2) receberam solução salina intraperitoneal tiveram fluorescência média de 0,96A.F.U. (+/-0,27), enquanto os animais sépticos receberam injeção intraperitoneal de fezes (n=4) e tiveram fluorescência média de 3,169(A.F.U.) (+/-0,95 p<0,05). Na análise de 24h os animais controle (n=3) receberam solução salina intraperitoneal seguido de antibiótico imipenem 6h depois. Os animais sépticos (n=5) foram submetidos a injeção de fezes intraperitoneal seguido de antibiótico imipenem 6h depois. A média de fluorescência dos animais em controle foi de 0,72A.F.U. e em 24h de sepse de 1,25A.F.U.(+/-0,27 P<0,05) (Figura 4.11).

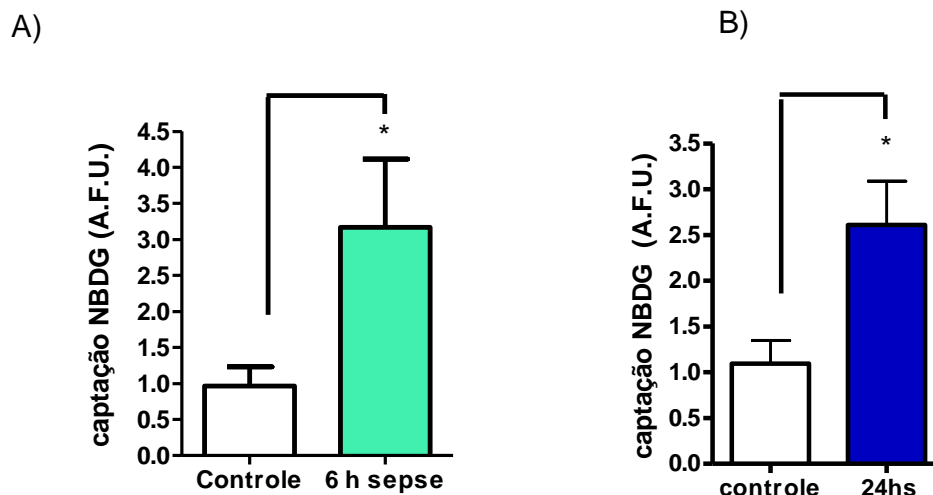


Figura 4.11: Captação de glicose no cérebro de animais sépticos. A captação de glicose foi monitorada pelo análogo fluorescente 6-NBDG em animal controle que recebeu salina intraperitoneal e antibiótico imipenem (10mg/kg) 6h depois e em animais submetidos a injeção intraperitoneal de fezes (5mg/grama de peso do animal) e antibiótico imipenem (10mg/kg) 6h depois.. A) análise da captação de NBDG no animal controle (n=2) e 6h (n=4). *p=0,0475 (t test não pareado) B) Captação de NBDG em corte de córtex cerebral no animal controle (n=3) e 24h (n=5). *p= 0,0272.

A avaliação mitocondrial é feita pelo consumo de oxigênio por corte de córtex cerebral em meio com glicose e adição progressiva de oligomicina. Animais controle (n=7) receberam injeção de salina intraperitoneal seguido de antibiótico imipenem 6h depois. Os sépticos para a avaliação em 6h (n=5) foram submetidos a injeção de fezes. Os sépticos para avaliação em 24h foram submetidos a injeção de fezes intraperitoneal seguido de antibiótico imipenem 6h depois. Podemos observar que os animais analisados com 6h de sepse consomem mais oxigênio se comparados aos animais controle. Os animais analisados com 24h de sepse apresentam diminuição no consumo de oxigênio. A comparação entre os animais com 6h e 24h de sepse mostra diferença significativa entre esses dois grupos (p<0,03). Não parece haver diferença quanto à ação da oligomicina (Figura 4.12).

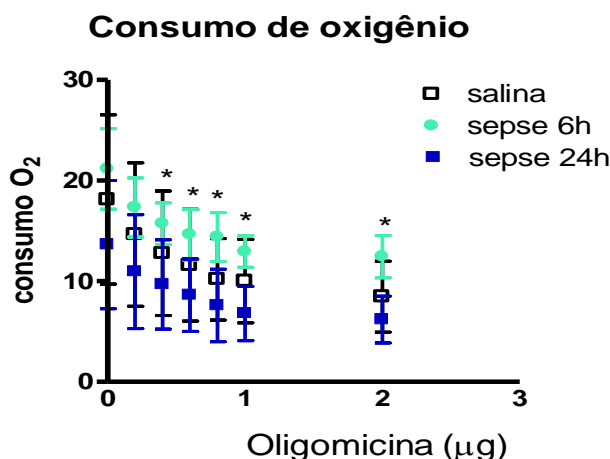


Figura 4.12: Consumo de oxigênio em fatias de córtex cerebral. O consumo de oxigênio foi avaliado em oxígrafo em meio com glicose e adição de oligomicina. animais controle (n=7) receberam salina intraperitoneal e antibiótico imipenem (10mg/kg) 6h depois. Os animais sépticos foram avaliados 6h (n=5) e 24h (n=5) após receberem injeção de fezes intraperitoneal (5mg/grama de peso do animal) e antibiótico imipenem (10mg/kg) 6h depois. Comparação entre os animais de 6h e 24h. *p<0,03.

4.8 Avaliação de estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado a partir da dosagem de TBARS. Para esta avaliação as estruturas cerebrais foram individualizadas. Os animais controle (n=2) receberam salina intraperitoneal enquanto os sépticos (n=4) receberam injeção de fezes intraperitoneal. A avaliação foi realizada após 6h. Houve aumento na dosagem de TBAR no pré frontal, estriado córtex e cerebelo em relação aos animais controle. Esse aumento foi mais evidente no pré frontal e no estriado. No estriado dosagem de TBARS foi de $2,63 \times 10^{-9}$ nmol/mg ptn no animal controle e $6,23 \times 10^{-9}$ nmol/mg ptn ($\pm 1,25 \times 10^{-9}$) 6h após a indução de sepse. No estriado os animais controle apresentaram dosagem de $2,88 \times 10^{-9}$ nmol/mg ptn ($\pm 5,53 \times 10^{-9}$) e os sépticos $6,75 \times 10^{-9}$ nmol/mg ptn ($\pm 9,34 \times 10^{-9}$). No córtex os animais controle apresentaram dosagem de $2,99 \times 10^{-9}$ nmol/mg ptn ($\pm 6,91 \times 10^{-9}$) e os sépticos $3,71 \times 10^{-9}$ nmol/mg ptn ($\pm 4,68 \times 10^{-9}$). No cerebelo os animais controle apresentaram dosagem de $3,71 \times 10^{-9}$ nmol/mg ptn ($\pm 2,07 \times 10^{-9}$) e os sépticos $4,73 \times 10^{-9}$ nmol/mg ptn ($\pm 4,02 \times 10^{-9}$) (Figura 4.13). Medimos TBARS também nos animais com 24h de sepse, porém os valores foram muito semelhantes aos animais controle (dados não mostrados).

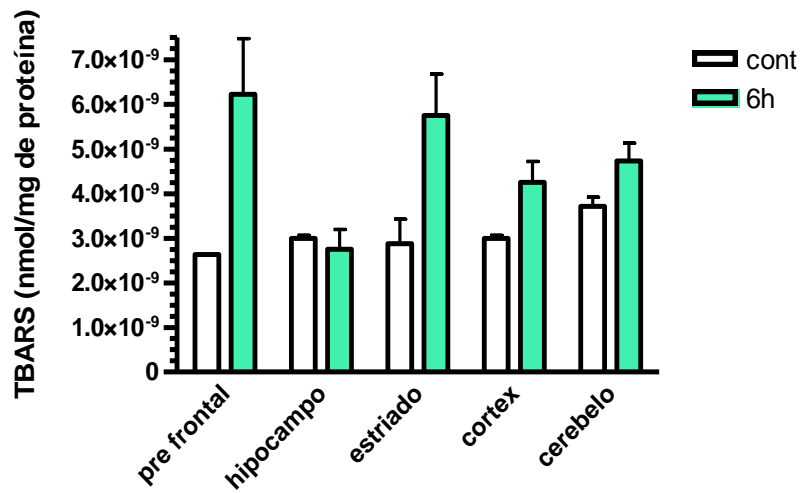


Figura 4.13: Avaliação de estresse oxidativo em diferentes estruturas cerebrais. Dosagem de TBARS em animais controle que receberam salina intraperitoneal (n=2) e 6h após a indução de sepsis por injeção de fezes intraperitoneal (5mg/grama de peso do animal) (n=4).

5.0 DISCUSSÃO

A síndrome de disfunção orgânica múltipla relacionada à sepse é a principal causa de morte nas unidades de terapia intensiva (Martin e cols.; 2003). Ainda que sua fisiopatologia não esteja totalmente esclarecida, várias evidências apontam para modificações fenotípicas que incluem alterações bioenergéticas, como redução no consumo de oxigênio pela mitocôndria durante as fases tardias da sepse (Singer; 2007). Parece haver uma correlação direta entre a gravidade da sepse, prognóstico e disfunção mitocondrial (Brealey e cols.; 2002).

Entre as disfunções orgânicas, a disfunção cerebral tem o aparecimento mais precoce e está diretamente relacionada a um pior prognóstico a curto e longo prazo (Sharshar e cols., 2007). Seu diagnóstico é feito a partir de avaliações neurológicas específicas, como o CAM, de preferência acompanhadas da interrupção da sedação. O delirium ocorre em até 80% dos pacientes em terapia intensiva e o seu aparecimento aumenta a incidência de demência e dano cognitivo permanente (Hopkins e col.; 2009). A disfunção cerebral na sepse pode repercutir de diferentes formas na morbidade e mortalidade do paciente séptico. É possível que a disfunção autonômica contribua para alterações hemodinâmicas que ocorrem durante a sepse. Sharshar e colaboradores (2004) mostraram que em pacientes que faleceram por sepse, isquemia e apoptose cerebral se concentram principalmente nos centros autonômicos. EAS parece estar mais associada a distúrbios na auto regulação do que no fluxo cerebral (Pfister e cols.; 2008)

Recentemente, importantes avanços foram feitos visando a redução de mortalidade de pacientes sépticos. Entre estes avanços podemos apontar a Campanha Sobrevivendo a Sepse, uma iniciativa de diferentes sociedades médicas afim de padronizar recomendações na abordagem da sepse grave (Dellinger e cols.; 2004). A campanha usou o sistema Delphi modificado para sugerir ações diagnósticas e terapêuticas para o paciente com sepse grave. O sistema Delphi modificado se baseia na qualidade da evidência que pode ser classificada em cinco níveis, de A a E, sendo A o nível mais alto e baseado em grandes estudos (Sackett; 1989). Em uma análise com 15022 pacientes de 165 diferentes unidades hospitalares, Levy e colaboradores (2010) mostraram que a implementação de orientações a serem seguidas nas primeiras 6 e 24h do diagnóstico da sepse foram capazes de diminuir a mortalidade hospitalar de 37% para 30,8% em dois anos. Apesar de reduções significativas na mortalidade, isso não repercutiu necessariamente em melhoria da qualidade de vida dos sobreviventes. Muitas vezes os pacientes que sobrevivem a um episódio de sepse grave ou choque séptico não são capazes de retomar suas atividades usuais e podem desenvolver algum dano neurológico transitório, ou até mesmo permanente (Hopkins e cols.; 2006).

Modelos experimentais que sejam representativos dos eventos que ocorrem na sepse clínica são essenciais para o estudo dos mecanismos bem como para o desenvolvimento de novas terapias na sepse. Nos últimos anos, um dos grandes dilemas no estudo da sepse foi a dificuldade em transferir os achados experimentais para a prática clínica bem como introduzir variáveis clínicas (ventilação mecânica, ressuscitação volêmica, antibióticos, etc.) nos modelos experimentais (Dyson.; 2009). Na prática, a evolução dos pacientes depende das comorbidades, da origem da sepse e das terapêuticas aplicadas, enquanto em modelos experimentais essas variáveis costumam não estar presentes, já que na maioria das vezes utilizamos animais jovens e saudáveis, com uma intensidade de doença e evolução temporal diferente daquela encontrada na clínica. Desta forma, estes fatores têm sido apontados como um dos motivos para o fato de que muitos estudos farmacológicos falharam na translação do resultado da bancada para a beira do leito (Marshall e cols.; 2005).

Nesta tese foram apresentados os resultados da padronização de um modelo de sepse abdominal polimicrobiana desenhado para reproduzir alguns dos aspectos da sepse em humanos. O uso de reposição volêmica e antibioticoterapia foram fatores incluídos no modelo, que consideramos importantes na aproximação deste para a condição clínica. Os achados de disfunção orgânica como choque, disfunção renal, hepática e hipoperfusão periférica estavam presentes no nosso modelo, representados por aumento na uréia, creatinina (figura 4.4), TGO, TGP (figura 4.5) e lactato sérico (figura 4.3) nas análises de 6 e 24 horas após a sepse. Desta forma, foi possível caracterizar a SDOM neste modelo.

A elevação de citocinas tanto no sangue periférico quanto no líquido peritoneal comprovaram a resposta inflamatória neste modelo. A IL-1 β é uma das primeiras citocinas a ser liberada na sepse e pode estar aumentada de 30 a 90 minutos após estímulo (Thijs e col.; 1995). No nosso modelo, o aumento da IL-1 β foi detectado no plasma nas primeiras 6h. IL-6 e MIP-1 α também apresentaram aumento tanto no sangue quanto no líquido peritoneal 6 e 24h após a indução da sepse.

Foi possível observar queda nos leucócitos totais, células mononucleares e neutrófilos no sangue, o que sugere migração e seqüestro dessas células pelo processo inflamatório. No líquido peritoneal houve aumento progressivo dessas células evidenciando a migração de células inflamatórias para o local do insulto. Esse conjunto de resultados nos fez acreditar que este modelo é capaz de representar diferentes aspectos da sepse em humanos.

A escolha deste modelo para o estudo da EAS não se deu por acaso. O fato do modelo de injeção de fezes não envolver ato cirúrgico e nem o uso de anestésicos foi determinante. Diversos estudos descrevem a presença de delirium como uma complicação pós operatória. O delirium no paciente cirúrgico piora o prognóstico e aumenta o tempo de internação. Há

controvérsias quanto se esta alteração neurológica está associada ao ato cirúrgico, resposta inflamatória sistêmica ou ao uso de anestésicos (Ramaiah e col.; 2009 e Sieber; 2009). Interpretamos que o uso do modelo CLP, o mais utilizado para estudo da sepse, poderia incluir fatores confundidores para o estudo da EAS, uma vez que inclui um procedimento cirúrgico e utiliza anestésicos para a analgesia/anestesia.

Trabalhos anteriores em sobreviventes de terapia intensiva mostraram que a grande maioria dos pacientes apresenta algum grau de dano cognitivo no momento da alta hospitalar. Girard e colaboradores (2010) relacionaram a presença de delirium com dano cognitivo a longo prazo. Estes autores avaliaram pacientes ventilados mecanicamente que apresentaram delirium na unidade de terapia intensiva. A média do tempo que os pacientes permaneceram em delirium foi de dois dias. Na avaliação três meses após a internação na terapia intensiva, 80% dos pacientes apresentavam algum grau de dano cognitivo. Ainda que o número de pacientes com dano cognitivo grave tenha diminuído ao longo de um ano, 70% dos pacientes ainda apresentavam algum déficit na avaliação de 12 meses. A principal alteração observada em pacientes após estarem na terapia intensiva foi déficit de memória (Hopkins e cols.; 1999 e Angus e cols.; 2001).

Para avaliar o dano cognitivo no modelo de injeção de fezes intraperitoneal realizamos o teste de habituação ao campo aberto ("open field"). Este teste é capaz verificar dano cognitivo, mais especificamente a capacidade exploratória e alterações na memória de roedores (Vianna e cols.; 2000). Nossos resultados mostraram que os animais controle perderam o interesse exploratório no segundo dia (teste) que entram em contato com a caixa de avaliação, por reconhecerem o meio que tiveram contato no dia anterior (treino) (figura 4.10). Já os animais que sobreviveram a sepse mantiveram o mesmo grau de exploração no primeiro e no segundo dia de avaliação, sugerindo uma incapacidade de reconhecer o ambiente com o qual teve contato no dia anterior.

A capacidade de fixação de memória destes animais foi analisada 10 dias após a sepse, período no qual já houve recuperação do processo infeccioso. Não há relato na literatura desta mesma análise realizada em camundongos. Quando comparados com uma avaliação semelhante realizada em ratos, os achados são bastante próximos (Barichello e cols.; 2005). A presença de um déficit cognitivo nestes animais mimetiza ao menos parcialmente o que observamos em pacientes que sobrevivem à sepse. Nossos resultados confirmam a presença de EAS neste modelo experimental e nos permite a investigação dos mecanismos biológicos envolvidos.

A fisiopatologia da EAS ainda não é totalmente esclarecida. O dano cognitivo a longo prazo pode estar relacionado a alterações que ocorrem agudamente durante a sepse. A

presença de quebra da barreira hematoencefálica já foi demonstrada durante a sepse (Bozza e cols.; 2009 e Sharshar e cols.; 2007). Falhas nesta barreira favorecem o contato do sistema nervoso central com componentes bacterianos, favorecendo a ativação da microglia. Este processo neuro-inflamatório também inclui a produção de citocinas no tecido cerebral. Alterações no metabolismo cerebral, bem como a geração de dano oxidativo durante a sepse já foram demonstradas (Dávila e cols.; 2008 e Barrichello e cols.; 2006) Nos perguntamos se essas alterações variavam ao longo do curso da sepse (6 e 24h) e qual seria o envolvimento do metabolismo cerebral de glicose nesta fisiopatologia.

A glicose é o principal substrato para o metabolismo cerebral. Transportadores de glicose conhecidos como GLUT transportam glicose da corrente sanguínea para o cérebro. GLUT 1 está presente principalmente em células endoteliais da BHE enquanto GLUT 3 está presente nos neurônios. GLUT 1 é capaz de regular a captação de glicose pela sua presença na parede luminal das células endoteliais. Havendo necessidade, transportadores podem ser recrutados aumentando o número de GLUT 1 luminal (Simpson e cols.; 2007). De uma forma geral, 85% da energia cerebral é consumida pelos neurônios que utilizam com substrato preferencial a glicose (Porrás e cols.; 2004). A glicose se difunde da lâmina basal e interstício para dentro do neurônio. Uma vez dentro do neurônio a glicose pode ser usada para o metabolismo oxidativo ou para geração de lactato. O lactato gerado pelo neurônio serve de fonte energética para astrócitos. Quando estimulado, o neurônio aumenta a geração de lactato que se difunde para o interstício e é captado por astrócitos. O lactato também é capaz de atravessar a BHE chegando a circulação sistêmica (Simpson e cols.; 2007) .

O 6-NBDG é um análogo fluorescente da glicose capaz de entrar na célula através dos transportadores de glicose e representa uma ferramenta simples e valiosa na análise da captação de glicose celular. A partir desta metodologia foi possível documentar aumento na captação de glicose pelo córtex cerebral 6h e 24h após a indução da sepse (figura 4.11). O aumento da captação de glicose em diversos tecidos durante a sepse já foi documentada (Meszaros e cols.; 1987 e Vary e cols.; 1995), tanto em humanos quanto em animais. No entanto, no caso do cérebro a literatura ainda é bastante limitada e os resultados conflitantes. Dois trabalhos analisaram a captação de glicose por tomografia por emissão de prótons em cérebros de ratos submetidos a endotoxemia (Battelino e cols.; 1996 e Semmler e cols.; 2008). Ambos mostraram diminuição na captação de glicose. Esse resultado foi o oposto do que encontramos. A técnica de tomografia por emissão de prótons exige que o animal seja sedado o que pode justificar diminuição no metabolismo de glicose. Por outro lado, Bozza e colaboradores (manuscrito em preparação) utilizando essa mesma técnica de tomografia por

emissão de prótons, evidenciaram aumento na captação de glicose cerebral 2h, 6h e 24h após a indução da sepse.

Não encontramos na literatura análise da captação de glicose durante a sepse por NBDG apesar de esta técnica ser equivalente a tomografia por emissão de prótons (Sheth e cols.; 2009). A medida da captação de glicose reflete a demanda metabólica do tecido e/ou uma maior disponibilidade de receptores GLUT 1 na superfície luminal da BHE. Em um modelo de isquemia e reperfusão cerebral em ratos, observou-se que na presença de isquemia há diminuição na captação de glicose na área de infarto, porém aumento de captação na área de penumbra. A diminuição na captação de glicose durante a isquemia está relacionada com a injúria celular irreversível (Martin e cols.; 2009). Neste caso, acredita-se que o aumento na captação de glicose está relacionado a melhor prognóstico e favorece a recuperação celular na área de penumbra.

Por outro lado, hiperglicemia cerebral está relacionada a disfunção mitocondrial, aumento no estresse oxidativo e conseqüentemente apoptose (Singer; 2008). Além disso, a hiperglicemia aumenta a vulnerabilidade da microglia ao LPS (Lacobone e cols.; 2009) intensificando a resposta inflamatória. A indução de hiperglicemia em cérebro de embriões de ratos está relacionada ao aumento da produção de ROS (Silva e cols.; 2004). A inflamação é capaz de mobilizar receptores GLUT para a parede luminal da célula na BHE, aumentando a captação da glicose o que pode contribuir para o dano oxidativo que por sua vez está presente em diversas doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Bishop e cols.; 2010).

Geração de energia pela mitocôndria é um sistema complexo e em parte controlado pela demanda metabólica. Em períodos de maior atividade a produção de ATP aumenta visando manter níveis mínimos e evitando o desencadeamento do processo de apoptose. Queda abrupta na oferta de oxigênio compromete drasticamente o metabolismo celular. Por outro lado, queda gradativa permite um processo de adaptação fenotípica da célula podendo ser um mecanismo de proteção a inflamação prolongada (Singer e cols.; 2007). Este processo se assemelha ao de hibernação. Levy e colaboradores (2005) descreveram alterações histológicas durante a sepse que são análogas àquelas encontradas durante o processo de hibernação como depósito de glicogênio e aumento na regulação dos transportadores de glicose. Uma vez que o paciente sobrevive a sepse, o metabolismo é restaurado, há aumento energético e o órgão acometido tende a se recuperar. No entanto, o papel desempenhado pelo aumento da captação de glicose nas fases iniciais da sepse em relação a geração de ROS e a disfunção mitocondrial, requer futuras investigações.

Durante a sepse ocorrem mudanças funcionais e estruturais na mitocôndria. As principais alterações estruturais são perda na integridade da membrana interna e inchamento

da mitocôndria (Singer; 2007). Em relação as alterações funcionais alguns mecanismos estão envolvidos. É possível observar inibição de complexos da cadeia mitocondrial e/ou desacoplamento sugerindo perda da eficiência da fosforilação oxidativa seja pela ativação de proteínas desacopladas ou pela abertura dos poros de permeabilidade com dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). A cadeia respiratória é alvo de diversas substâncias geradas durante a sepse. O TNF α e NO diminuem a atividade da citocromo c oxidase. Peroxinitrito gerado a partir reação de NO com ânion superóxido inibe os complexos I e III da cadeia respiratória (Harrois e col.; 2009).

Glutathione é um importante antioxidante e protege o complexo I mitocondrial de espécies reativas. Quando há depleção de glutathione o complexo I é inativado e esta é a principal alteração encontrada na cadeia mitocondrial durante a sepse (Singer; 2008). Em um estudo *in vivo* com ratos sépticos, a administração de succinato, que doa elétron diretamente para o complexo II ultrapassando o bloqueio do complexo I, foi capaz de reverter completamente a queda no consumo de oxigênio (Protti e cols.; 2007).

Mudanças no funcionamento da bioenergética cerebral representam mecanismos comuns entre os diferentes processos neurodegenerativos. O desenvolvimento de déficit cognitivo e demência estão diretamente relacionados com disfunção mitocondrial e estresse oxidativo em diferentes doenças neurológicas (Bishop e cols.; 2010). Nas doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, não há perda neuronal significativa, mas sim alteração nas sinapses prejudicando a conectividade e integridade cerebral. A presença de disfunção mitocondrial diminui a expectativa de vida de alguns invertebrados, enquanto o aumento da respiração mitocondrial é capaz de aumentar a expectativa de vida de leveduras (Bishop e cols.; 2010). No Alzheimer os complexos mitocondriais IV e V apresentam disfunção (Ferrer.; 2009). Alterações no complexo IV também ocorrem na disfunção mitocondrial na sepse (D'ávila e cols.; 2008). A disfunção mitocondrial tende a atingir principalmente células com alta demanda energética, e o cérebro por ter alto consumo de oxigênio por grama de tecido e poucas defesas antioxidantes, se torna bastante suscetível durante a sepse (Halliwell; 2006).

Nesta tese observamos alterações na função mitocondrial em fatias de córtex cerebral. A avaliação da função mitocondrial foi realizada a partir de medidas do consumo de oxigênio em respirografia de alta resolução. No nosso protocolo, adicionamos glicose, que serviu como substrato para cadeia respiratória e oligomicina como um inibidor da ATP sintase. A adição gradativa de oligomicina foi responsável pela diminuição do consumo de oxigênio observada após a sua adição, tanto nos animais sépticos quanto nos controles (figura 4.12). Nas primeiras 6h após a indução da sepse, observamos um aumento no consumo de oxigênio em

relação ao animal controle. Já em 24h, o consumo de oxigênio caiu abaixo do controle. Diversos estudos (revisto por Singer, 2007) mostram mudanças na função mitocondrial durante a sepse. Poucos estudos dão ênfase na disfunção mitocondrial nas primeiras 6h da sepse. Rosser e colaboradores (1998) verificaram em 6h aumento no consumo de oxigênio por hepatócitos expostos à endotoxina. Em 24h o consumo de oxigênio caiu significativamente. Estudo realizado em ratos sépticos mostrou aumento da fosforilação oxidativa em mitocôndria hepática com posterior diminuição em 18h (Ohtoshi e cols.; 1984). Não encontramos relatos na literatura de medida de consumo de oxigênio cerebral nas primeiras 6h de sepse.

D`Ávila e colaboradores (2008) avaliaram a disfunção da mitocôndria cerebral em 24h de sepse. Foi observado o consumo de oxigênio após adição de ADP em homogenato de cérebro de animais controle e animais submetidos ao CLP. Após a adição de ADP, os dois grupos mantiveram o mesmo consumo de oxigênio para produção de ATP. O consumo de oxigênio acoplado a síntese de ATP é chamado de estado 3. Uma vez que todo o ADP foi consumido, não há mais produção de ATP. O consumo de oxigênio não relacionado com a síntese de ATP é chamado de estado 4. Os animais sépticos mostraram aumento na respiração no estado 4 sugerindo desacoplamento da fosforilação oxidativa.

Nesta tese, não foi realizado o estudo específico dos estados 3 e 4. Não sabemos se o aumento no consumo de oxigênio que encontramos nas primeiras seis horas está relacionado ao aumento na produção de ATP ou ao desacoplamento mitocondrial. A queda no consumo de oxigênio induzido pela oligomicina pode ser uma evidência contra o desacoplamento, uma vez que o consumo de oxigênio cai com a inibição gradual da ATP sintase, podemos supor que este oxigênio estava sendo usado para produção de ATP.

Outra possibilidade para o aumento no consumo de oxigênio seria o aumento no número de mitocôndrias no animal séptico devido a biogênese mitocondrial. Este fenômeno já foi descrito em pacientes sépticos e está inclusive relacionado com melhor prognóstico (Carré e cols.; 2010). No entanto a biogênese mitocondrial costuma ser mais tardia, característica da fase de recuperação do metabolismo oxidativo (Haden e cols.; 2007). Aumento no RNAm do PGC1alpha (coativador transcripcional da biogênese mitocondrial) e na superóxido dismutase manganês (proteína do estresse oxidativo mitocondrial) na musculatura de pacientes que sobreviveram a sepse comprova que a presença de biogênese mitocondrial e de defesas antioxidantes estão relacionados com a recuperação da sepse e com um melhor prognóstico (Carré e cols.; 2010).

A diminuição no consumo de oxigênio em 24h pode estar relacionada ao processo de hipóxia citotóxica no qual a célula não consome oxigênio, independente da sua disponibilidade. Este processo de diminuição na necessidade e na produção de energia pela

célula que já foi interpretado como puramente patológico, credita-se ser parte do processo de adaptação e preservação celular. A inibição da cadeia respiratória ocorre por inativação dos complexos a pela ação direta gases produzidos durante o processo inflamatório como óxido nítrico, monóxido de carbono e sulfeto de hidrogênio. Esses gases competem com o oxigênio pela citocromo oxidadase e favorecem a formação de espécies reativas.

O oxigênio é necessário para produção de ATP, por outro lado, é substrato para a geração de ROS que podem ser extremamente tóxicas para a célula. Por ter alto metabolismo e pouca capacidade de regeneração, o cérebro é mais sensível ao estresse oxidativo do que outros órgãos. O estresse oxidativo está presente na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas crônicas como Parkinson e Alzheimer (Navarro e col.; 2009 e Bishop e cols.; 2010) assim como nas alterações neurológicas agudas como a EAS. O estresse oxidativo influencia diretamente a mitocôndria. Espécies reativas de nitrogênio e ROS inibem a cadeia respiratória mitocondrial, mais especificamente os complexos I e IV (Singer e cols.; 2007). O próprio envelhecimento é capaz de aumentar o estresse oxidativo cerebral. Há controvérsias se o estresse oxidativo seria o evento desencadeador da neurodegeneração, porém não há dúvida de que ele é capaz de aumentar o dano celular colaborando para o dano cognitivo (Andersen; 2004).

Seguindo esta linha de raciocínio, estudos experimentais em ratos submetidos a CLP foram realizados para verificar a capacidade neuroprotetora de substâncias antioxidantes. N-acetil-cisteína e deferoxamina em conjunto foram capazes de prevenir dano oxidativo no hipocampo assim como distúrbios de aprendizado e de memória observados nos animais sépticos (Barichello e cols.; 2007). Na malária cerebral, é comum haver desenvolvimento de déficit cognitivo. O uso da N-acetil-cisteína e deferoxamina preveniu o déficit cognitivo em modelos relevantes de malária cerebral em camundongos (Reis e cols.; 2010). Substâncias antioxidantes podem ter papel importante no tratamento na EAS.

Nesta tese analisamos o estresse oxidativo a partir da medida de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). TBARS, produto da peroxidação lipídica, são marcadores indiretos de estresse oxidativo. Nas primeiras 6h de sepse encontramos aumento de TBARS em diversas regiões do cérebro. Não observamos qualquer alteração na quantidade de TBARS em 24h (dados não mostrados). Isso mostra que o estresse oxidativo no cérebro é precoce, diferente de outros tecidos. Esses resultados são compatíveis com a literatura (Barichello e cols.; 2006). Em humanos já foi demonstrado presença de TBARS no liquor de pacientes com EAS (Takezawa e cols.; 1983). O aumento na peroxidação lipídica também ocorre em doenças associadas a dano cognitivo crônico como Parkinson e Alzheimer (Andersen; 2004).

Padrões moleculares associados a microorganismos e citocinas pró inflamatórias geram ativação endotelial com aumento da expressão de moléculas de adesão e mudança no tônus vascular. Há ruptura da BHE e a resposta inflamatória gerada pela sepse é capaz de atingir o cérebro. A microglia, principal célula imune presente no cérebro, em condições fisiológicas expressa o seu fenótipo desativado. Porém, quando há quebra da BHE, por terem na sua superfície TLR, a microglia é capaz de reconhecer moléculas associadas a patógenos circulantes. A partir desse momento a resposta inflamatória é desencadeada com produção de citocinas em colaboração com a resposta sistêmica. Geralmente esta resposta é limitada e interrompida uma vez que a infecção foi controlada. Quando o estímulo inflamatório permanece, com falha nos mecanismos fisiológicos de resolução, é desencadeado um processo de neurodegeneração (Glass e cols.; 2010).

A partir do conjunto de resultados desta tese, fomos capazes de estabelecer um cenário geral dos possíveis mecanismos envolvidos na EAS. Nas primeiras 6 horas da sepse, o que observamos foi um aumento no consumo de oxigênio e na captação de glicose pelo córtex cerebral. Há ainda aumento do estresse oxidativo. Com a persistência do processo inflamatório, o consumo de oxigênio cai de maneira significativa em 24h. O consumo de glicose continua alto podendo este ser substrato para respiração anaeróbia com geração de lactato que pode servir como fonte energética para neurônios e astrócitos uma vez que a geração de ATP pela cadeia respiratória mitocondrial encontra-se diminuída.

A persistência da neuroinflamação com algum grau de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, está associado ao déficit cognitivo de longo prazo, não só na sepse mas em outros processos neurodegenerativos como Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica. Todas essas patologias têm fatores desencadeantes distintos, porém uma vez iniciadas a ativação na microglia leva a amplificação da resposta inflamatória e produção de mediadores neurotóxicos.

Nossas perspectivas futuras são compreender melhor diferença entre a EAS com boa recuperação e aquela que desencadeia a demência ou estabelece déficit cognitivo permanente. Pretendemos estudar a produção de espécies reativas de oxigênio e o papel da glicose no estresse oxidativo. Desta forma será possível colaborar com propostas terapêuticas para sepse que não só sejam capazes de diminuir a mortalidade mas de manter a qualidade de vida dos pacientes acometidos.

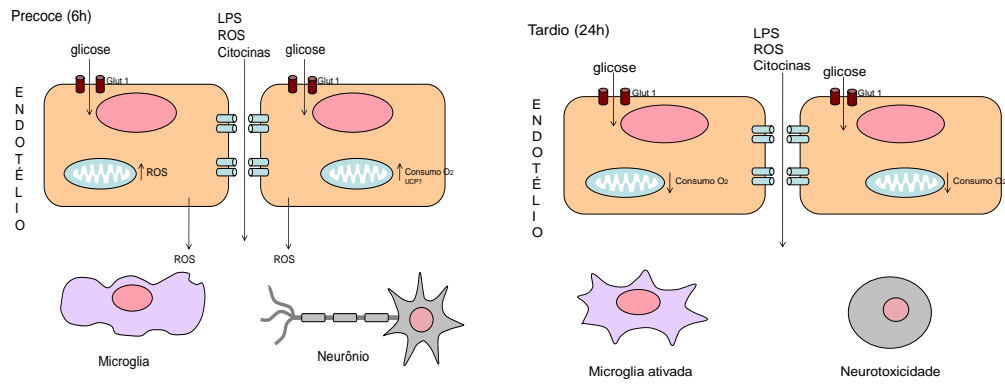


Figura 5.1: Fisiopatologia envolvida na encefalopatia associada a sepse. A ruptura da barreira hematoencefálica favorece a passagem de substâncias neurotóxicas. Nas primeiras 6h observamos aumento da captação de glicose, aumento no consumo de oxigênio e aumento no stress oxidativo. Em 24h a captação de glicose permanece aumentada, porém o consumo de oxigênio diminui e não detectamos aumento de stress oxidativo. Espécies reativas produzidas precocemente são capazes de ativar a microglia e causar neurotoxicidade.

6.0 CONCLUSÃO

- O modelo de injeção de fezes intraperitoneal é capaz de reproduzir a resposta inflamatória e as disfunções orgânicas induzidas pela sepse.
- O modelo de injeção de fezes intraperitoneal cursa com EAS e dano cognitivo.
- A EAS cursa com aumento da captação de glicose em 6h e 24h após indução da sepse.
- Nas primeiras 6h da sepse há aumento no consumo de oxigênio pela mitocôndria no córtex cerebral, com posterior queda em 24h.
- Diversas regiões do cérebro apresentam aumento do estresse oxidativo nas primeiras 6h após indução da sepse.

7.0 Bibliografía

1. Andersen JK. Oxidative Stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 2004; 10Suppl: S18-25.
2. Angus D, Linde-Zwirble W, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky M. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310.
3. Angus DC, Musthafa AA, Clermont G, Griffin MF, Linde-Zwirble WT, Dremsizov TT, Pinsky MR. Quality-adjusted survival in the first year after the acute respiratory distress syndrome. *Am J respire Crit Care* 2001; 163:1389-1394.
4. Barichello T, Fortunato J, Vitali A, Feier G, Reinke A, Moreira J, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation, *Crit Care Med* 2006; 34: 886-889.
5. Barichello T, Machado RA, Constantino L, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho F, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in animal model of sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35(9):2186-2190.
6. Battelino T, Goto M, Krzysnik C, Zeller P. Tissue glucose transporters in suckling rats with endotoxemic shock. *Shock* 1996; 6:259-262
7. Beale R, Reinhart K, Dobb G, Silva E, Le Clerc J, Basson B, Angus D. PROGRESS (Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis): a preliminary report of an international internet-based registry. *Chest* 2003; 124:224.
8. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
9. Bishop NA, Lu T, Yankner BA. Neuronal mechanism of ageing and cognitive decline. *Nature* 2010; 464: 529-535.
10. Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, Taboada F, Gandía F, Tamayo L, Collado J, García-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, De Frutos M, López MJ, Caballero A,

- Guerra J, Alvarez B, Mayo A, Villar J. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care* 2008; 12:R158.
11. Bozza FA, Garteiser P, Oliveira M, Doblaz S, Cranford R, Saunders D, Jones I, Towner R, Castro-Faria H. Sepsis-associated encephalopathy: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *JCBFM* 2009; 215:1-9.
 12. Bozza FA, Carnevale R, Japiassu AM, Castro-Faria-Neto HC, Angus DC, Dalluh J. Early fluid resuscitation in sepsis: evidence and perspectives. *Shock* 2010; 34(S1):40-43.
 13. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002; 360:219-223.
 14. Bradley D, Karyampudi S, Jacques T, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski R, Singer M. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R491-R497.
 15. Brun-Buisson C, Mashaka P, Pinton P, Vallet B, EPISEPSIS Study Group. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30(4): 580-588.
 16. Buras J, Hmlzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: Setting the stage. *Nature* 2005; Rev 4: 854-865.
 17. Castallanos-Ortega A, Suberviola B, Garcia-Astudillo A, Holanda MS, Ortiz F, Llorca J, Delgado Rodrigues M. Impact of the Survivin Sepsis Campaign protocols on hospital length of stay and mortality in septic shock patients: results of a three year follow-up quasi-experimental study. *Crit Care Med* 2010; 38(4):1036-1043.
 18. Carré JE, Orban JC, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, Suliman HB, Piantadosi CA, Mayhew TM, Breen P, Stotz M, Singer M 2010. Survival in critical care illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Respir Crit Care* (Epub ahead of print).
 19. Carré JE, Singer M. Cellular energetic metabolism in sepsis: The need for a systems approach. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1777:763-771.

20. Cinel I, Opal S. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med* 2009; 37:291-304.
21. Crouser ED, Julian MW, Joshi MS, Bauer JA, Wewers MD, Hart JM, Pfeiffer DR . Cyclosporin A ameliorates mitochondrial ultrastructural injury in the ileum during acute endotoxemia. *Crit Care Med* 2002; 30:2722–2728.
22. D’Avila JCP, Santiago APSA, Amâncio RT, Galina A, Oliveira MF, Bozza FA. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med* 2008; 36:1925-1932.
23. Deitch E. Rodent Model of Intra-Abdominal Infection. *Shock* 2005; 24: 19-23.
24. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2004; 30:536-555.
25. Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med* 2009; 37: S30-S37.
26. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33:606-618.
27. Ferrer I. Altered mitochondrial energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer`s disease. *J Bioenerg Biomemb* 2009; 41(5):425-431.
28. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, Stahel PF. Pathophysiology of septic encephalopathy-an unsolved puzzle. *Crit Care* 2010; 14:165-166.
29. Fink MP. Citopathic hypoxia in sepsis: a true problem? *Minerva Anesthesiol* 2001; 67(4): 290-291.
30. Frink M, van Griensven M, Kobbe P, Brin T, Zeckey C, Vaske B, Krettek C, Hildebrand F. IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries. *Scand J Trauma Resusc Emerg* 2009; Med 17:49

31. Gando S. Microvascular Thrombosis and Multipla Organ Dysfunction Syndrome. *Crit Care Med* 2010; 38: S35-S42.
32. Girard TD, Jackson JC, Pandharipande PP, Pun BT, Thompson JL, Shintani AK, Gordon SM, Canonico AE, Dittus RS, Bernard GR, Ely W. Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness. *Crit Care Med* 2010; 38:1513-1520.
33. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanism undelying inflamation in neurodegeneration. *Cell* 2010; 140(6):918-934.
34. Halliwell B. Oxidative stress and neuro degeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97:1634-1658.
35. Haden DW, Suliman HB, Carraway MS, Welty-Wolf KE, Ali AS, Shitara H, Yonekawa H, Piantadosi CA. Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism durng *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(8):768-777.
36. Heymann A, Spies C. Postoperative delirium and cognitive deficit. Prevention and therapy. *Anesthesiol Intensiv Med NotfallmedSchmerzther* 2010; 45:112-116.
37. Hopkins RO, Weaver LK, Pope D, Orme JF, Bigler ED, Larson-lohr V. Neuropsychological sequeale and impairmenthealth status in survivors of severe acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 161:50-56.
38. Hopkins RO, Jackson JC. Long-term neurocognitive function after critical care illness. *Chest* 2006; 130:869-878.
39. Hopkins RO, Jackson JC. Short- and long-term cognitive outcomes in intensive care unit survivors. *Clin Chest Med* 2009; 30:143-153.
40. Horrois A, Huet O, Duranteau J. Alterations of mitochondrial function in sepsis and critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol* 2009; 22:143-149.
41. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JO, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27:1230-1251.

42. Hubbard W, Choudhry M, Schwacha M, Kerby J, Rue III L, Bland K, Chaudry I. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005; 24: 52-57.
43. Inouye SK, van Dick CH, Alessis CA, Balkin S, Siegal AP, Horwitz RJ. Clarifying confusion: the confusion assessment method. A new method for detection of delirium. *Ann Intern Med* 1990; 113:941-948.
44. Kress JP, Pohlman AS, O'Connor MF, Hall JB. Daily interruption of sedative infusions in critically ill patients undergoing mechanical ventilation. *N Engl J Med* 2000; 342(20):1471-1477.
45. Kress JP. The complex interplay between delirium, sepsis and sedation. *Crit Care* 2010; 14(3):164.
46. Lacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med* 2009; 37: S331-S336.
47. Lacombe E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens R, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med* 2009; 37:S331-S336.
48. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ* 2007; 335:879-883.
49. Levi M, Tom P. Inflammation and Coagulation. *Crit Care Med* 2010; 38:S26-S34.
50. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; for the International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250-1256.
51. Levy MN, Dellinger RP, Townsend RS, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, Schorr C, Artigas A, Ramsay G, Beale R, Parker MM, Gerlach H, Reinhart K, Silva E, Harvey M, Regan S, Angus DC, on behalf of the Surviving Sepsis Campaign. The Surviving Sepsis Campaign: Results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38(2):367-374.

52. Levy RJ, Piel DA, Acton PD, Zhou R, Ferrari VA, Karp JS, Deutschman CS. Evidence of myocardial hibernation in the septic heart. *Crit Care Med* 2005; 33:2752-2756.
53. Lucas S-M, Rothwell N, Gibson R. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British J Pharmacol* 2006; 147:S232-S240.
54. Laurilla JV, Pitkala KH, Strandberg TE, Tilvis RS. Impact of different diagnostic criteria on prognosis of delirium: a prospective study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004; 18:240-244.
55. Marshall J, Deitch E, Moldawer L, Opal S, Redl H, Van der Poll T. Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us? *Shock* 2005; 24: 1-6.
56. Martin A, Rojas S, Santalucia T, Milán O, Abasolo I, Gómez V, Llop J, Gispert JD, Falcon C, Bargalló N, Planas AM. Depressed glucose consumption at reperfusion following brain ischemia does not correlate with mitochondrial dysfunction and development of infarction: an in vivo positron emission tomography study. *Curr Neurovasc Res* 2009; 6(2):82-88.
57. Martin G, Mannino D, Eaton S, Moss M 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through. *N Engl J Med* 2000; 348,16: 1546-1554.
58. Mela L, Miller LD. Efficacy of glucocorticoids in preventing mitochondrial metabolic failure in endotoxemia. *Circ Shock* 1983; 10:371-381
59. Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20:864-874.
60. Merenda A, Bullock R. Clinical treatments for mitochondrial dysfunction after brain injury. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12:90-96
61. Meszaros K, Lang CH, Bagby GJ, Spitzer JJ. Contribution of different organs to increased glucose consumption after endotoxin administration. *J Biol Chem* 1987; 262:10965-10970.
62. Mitchell M, Levy R, Phillip Dellinger, Sean R. Townsend, Walter T. Linde-Zwirble, John C. Marshall, Julian Bion, Christa Schorr, RN, Antonio Artigas, Graham

- Ramsay, Richard Beale, Margaret M. Parker, Herwig Gerlach, Konrad Reinhart, Eliezer Silva, Maurene Harvey, Susan Regan, Derek C. Angus, on behalf of the Surviving Sepsis Campaign. The surviving sepsis campaign: results of an international guidelinebased performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38: 367-374.
63. Mizobata Y, Prechek D, Rounds JD, Robinson V, Wilmore DW, Jacobs DO. The duration of infection modifies mitochondrial oxidative capacity in rat skeletal muscle. *J Surg Res* 1995; 59:165–173.
64. Moreno R, Vincent JL, Matos R, Mendonça A, Cantraine F, Thijs L, Tajala J, Sprung C, Antonelli M, Bruining H, Willatts S. The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicenter study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Inten Care Med* 1999; 25(7):686-696.
65. Mayes PA, Bothlam KM. Bioenergetics and the metabolism of carbohydrates & Lipids. In *Harpers Illustrated Biochemistry*. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 26th edition. Lange Medical Publications - International Edition - 2003 - 80-101.
66. Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson`s disease. *J Bioenerg Biomembr* 2009; 41(6):517-521.
67. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K, Nakamura M. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine* 2005; 29:169-175.
68. Ohtoshi M, Jikko A, Asano M, Ushida K, Ozawa K, Tobe T. Ketogenesis during sepsis in relation to hepatic energy metabolism. *Res Exp Med (Berl)* 1984; 184:209–219
69. Opal SM, Wherry JC, Grint P. Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1998; 27:1497-1507

70. Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, Young D, Rowan K. Epidemiology of Severe Sepsis Occurring in the first 24hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med* 2003; 31(9): 2332-2338.
71. Pfister D, Siegmund M, Dell Kuster S, Smielewski P, Rüegg S, Strebel SP, Marsch SC, Pargger H, Steiner LA. Cerebral Perfusion in sepsis-associated delirium. *Crit Care* 2008; 12(3):R63.
72. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 1993; 103:565-575.
73. Porras HP, Loiaza A, Barros LF 2004. Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24(43):9669-9673.
74. Protti A, Singer M. Bench-to-bedside review: potential strategies to protect or reverse mitochondrial dysfunction in sepsis-induced organ failure. *Crit Care* 2006; 10: 228-234.
75. Protti A, Carré C, Frost MT, Taylor V, Stidwill R, Rudiger A, Singer M. Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. *Crit Care Med* 2007; 35:2150-2155.
76. Ramaiah R, Lam AM. Postoperative cognitive dysfunction in the elderly. *Anesthesiol Clin* 2009; 27(3):485-496.
77. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective Study. *JAMA* 1995; 273(2): 117-123.
78. Reis PA, Comin CM, Silva B, Barichello T, Portella AC, Gomes FCA, Sab IM, Frutoso VS, Oliveira MF, Bozza PT, Bozza FA, Dal-Pizzol F, Zimmerman GA, Quevedo J, Castro-Faria-Neto HC. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *Plos Pathog* 2010; 6(6):e1000963.
79. Remick D, Ward P. Evaluation of endotoxin models for the study os sepsis. *Schock* 2005; 24: 7-11.

80. Rittirsch D, Hoesel L, Ward P. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J leuk biol* 2007; 81: 137-143.
81. Rivers E, Kruse J, Jacobsen G, Shah K, Loomba M, Otero R, Childes E. The influence of early optimization on biomarker patterns of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2007; 35: 2016-2024.
82. Rosser DM, Manji M, Cooksley H, Bellingan G. Endotoxin reduces maximal oxygen consumption in hepatocytes independent of any hypoxic insult. *Intensive Care Med* 1998; 24:725-729.
83. Rothenhausler HB, Ehrentraut S, Stoll C, Schelling G, Kampfhammer HP. The relationship between cognitive performance and employment and healthstatus in long-term survivors of acute respiratory distress syndrome: result of an exploratory study. *Gen Hosp Psychiatry* 2001; 23(2):90-96.
84. Russel JÁ, Singer J, Bernard GR, Wheeler A, Fulkerson W, Hudson L, Schein R, Summer W, Wright P, Walley KR. *Crit Care Med* 2000; 28(10):3405-3411.
85. Sackett DL. Rules of evidence and clinical recommendations on the use of antithrombotic agents. *Chest* 1989; 95(suppl.2):2S-4S.
86. Sale Ja Jr, David CM, Hatum R. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. *RBTI* 2006; 18:9-17.
87. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin the siècle. *Science* 1999; 283(5407):1488-1493.
88. Sieber FE. Postoperative delirium in the elderly surgical patient. *Anesthesiol Clin* 2009; 27(3):451-464.
89. Semmler A, Hermann S, Mormann F, Weberpals M, Paxian S, Okull T, Schäfers M, Kummer M, Klockgether T, Heneka M. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation* 2008; 5:38-47.
90. Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, Brouland JP, Hopkinson NS, Françoise G. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol* 2004; 14(1):21-33.

91. Sharshar T, Carlier R, Bernard F, Guidoux C, Brouland J-P, Nardi GL Grandmaison, Aboab J, Gray F, Menon D, Annane D. Brain lesions in septic shock: a magnetic resonance imaging study. *Inten Care Med* 2007; 33:798-806.
92. Simpson JE, Ince PG, Higham CE, Gelstjrope CH, Fernando MS, Matthews F, Forster G, O'Brien JT, Barber R, Kalaria RN, Brayne C, Shaw PJ, Stoeber K, Williams GH, Lewis CH, Wharton SB, MRC cognitive function and aging neuropathology study group. Microglial activation in white matter lesions and nonlesional white matter of ageing brains. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 33(6): 670-683.
93. Sheth RA, Josephson L, Mahmood U. Evaluation and clinically relevant applications of a fluorescent imaging analog to fluodeoxyglucose positron emission tomography. *J Biomed Opt* 2009; 14(6):064014.
94. Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Souza EF, Abe TP, de Andrade J. Brazilian sepsis epidemiological study: (BASES study). *Crit Care* 2004; 8:251-260
95. Silva WS, Gómez-Puyou A, Gómez-Puyou MT, Sanchez RM, Felice FG, Meis L, Oliveira M, Galina A. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense. *JBC* 2004; 38:39846-39855.
96. Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med* 2007; 35: S441-S448.
97. Sogayar AMC, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grioso C, Lobo SM, Tura B, Silva CLO, Cal RGR, Beer I. For the Costs Study Group-Latin American Sepsis Institute > COSTS- Multicenter, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics* 2008; 26: 425-434.
98. Spapen H, Nguyen DN, Troubleyn J, Huyghens L, Schiettecatte J. Dotrecogin alfa (activated) may attenuate severe sepsis-associated encephalopathy in clinical septic shock. *Crit Care* 2010; 14:R54-R58.
99. Sprung CL, Cohen SL, Sjkqvist P, Baras M, Bulow HH, Hovilehto S, Ledoux D, Lippert A, Maia P, Phelan D, Schobersberger W, Wennberg E, Woodcock T. End-of-life practices in European intensive care units: the Ethicus Study. *JAMA* 2003; 290:790-797.

100. Sprung CL, Peduzzi PN, Shatney CH, Schein RM, Wilson MF, Sheagren JN, Hinshaw LB. Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. *Crit Care Med* 1990; 18:801–806
101. Takezawa J, Teenaka N, Nishijima MK, Hirata T, Okada T, Shimada Y, Yoshiya I. Amino acids and thiobarbituric substances in cerebrospinal fluid and plasma of patients with septic shock. *Crit Care Med* 1983; 11(11):876-879.
102. Taneja R, Parodo J, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC. Delayed Neutrophil apoptosis in sepsis associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase – 9 activity. *Crit Care Med* 2004; 32:1460-1469.
103. Thijs LG, Hack CE. Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive Care Med* 1995; 21 Supl 2:S258-S263.
104. Vary TC, Denevich D, Jurasinski C, Brennen WA. Mechanism regulating skeletal muscle glucose metabolism in sepsis. *Shock* 1995; 3:403-410.
105. Vincent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care* 2006; 173:256-263.
106. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Wilatts R, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis Related Problems of The European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; 22(7):707-710.
107. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock – A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29:189-201.
108. Wilson JX, Young BG. Sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *Can J Neurol Sci* 2003; 30: 98-105.
109. Yamada A, Yamamoto K, Imamoto N, Momosaki S, Hosoi R, Yamaguchi M, Inoue O. Lactate is an alternative energy fuel to glucose in neurons under anesthesia. *Neuroreport* 2009; 20(17): 1538-1542.

110. Yende S, D'Angelo G, Kellum JA, Weissfeld L, Fine J, Welch RD, Kong L, Carter M, Angus DC. Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:1242-1247.
111. Young GB, Bolton CF, Austin TW, Archibald YM, Gonder J, Wells GA. The encephalopathy associated with septic illness. *Clin Invest Med* 1990; 13:297-304.

EARLY FLUID RESUSCITATION IN SEPSIS: EVIDENCE AND PERSPECTIVES

Fernando A. Bozza,* Renata Carnevale,[†] André Miguel Japlassú,*
Hugo Calre Castro-Faria-Neto,[‡] Derek C. Angus,[‡] and Jorge I. F. Salluh[§]

Intensive Care Unit, Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, and [†]Immunopharmacology Laboratory, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; [‡]Department of Critical Care Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania; and [§]Intensive Care Unit, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

Received 29 Sep 2009; first review completed 12 Oct 2009; accepted in final form 4 Jan 2010

ABSTRACT—Hemodynamic instability plays a major role in the pathogenesis of systemic inflammation, tissue hypoxia, and multiple organ dysfunction in sepsis. Aggressive fluid replacement is one of the key interventions for the hemodynamic support in severe sepsis. In this scenario, the ability to restore the imbalance between tissue oxygen demand and supply, the heterogeneity in microcirculation, and endothelial dysfunction in the early stages of sepsis are associated with reduced mortality. In 2001, a single-center randomized controlled trial showed impressive reductions in hospital mortality when patients presenting to the emergency department with severe sepsis were treated with an aggressive protocol of fluids, blood transfusion, and inotropes aiming to improve tissue perfusion. However, external validation of this trial remains to be carried out. To date, there is no unequivocal evidence that such strategy is both universally feasible and effective. In the present article, we review the current evidence and comment on the future perspectives on early fluid resuscitation in severe sepsis.

KEYWORDS—Sepsis, Surviving Sepsis Campaign, hemodynamic optimization, shock, fluid replacement, early goal-directed therapy

ORIGINS

The origin of intravenous fluid therapy is believed to have occurred during the European cholera epidemic in 1831 in England (Fig. 1) [reviewed in Baskett (1) and MacGillivray (2)]. At this time, William Brooke O'Shaughnessy, a 22-year-old Irish physician, proposed that intravenous water and salt repletion should be part of cholera supportive care. This was followed by a landmark article published in the *Lancet* (3). Although first described only in an animal study, 1 year later Thomas Latta (4, 5) reported the improved outcomes of the first cases of cholera treated with intravenous saline solution. Latta proposed that a solution, very close to blood's electrolyte profile, could be effective for fluid replacement. The solution contained sodium at 134 mmol/L, chloride at 118 mmol/L, and bicarbonate at 16 mmol/L. The premature death of Latta interrupted the research on intravenous fluid therapy for decades until revived in the 1880s after works by Little and Barnes and Ringer in England and by Emil Schwarz in Germany. In 1921, Hamburger proposed "normal saline" for the first time (6), although intravenous fluid therapy remained unusual throughout the first part of the 20th century and was restricted to extremely ill patients. During World War II, blood transfusion was widely used to reverse hypovolemia and hemorrhagic shock in wounded soldiers (7). Physiologic studies demonstrated that augmenting blood with other fluids led to significant salt retention during trauma and led to a preference for colloids over crystalloids.

Enthusiasm for crystalloid infusion reemerged in the late 1960s after the research of Shires et al. (8) demonstrated better survival in animal models of hemorrhagic shock. In addition, the introduction of hemodynamic monitoring brought new insights to the physiologic basis of fluid therapy and soon became a routine bedside guide to fluid replacement. The overarching principle was that survival from shock was dependent on the need to optimize central venous pressure, cardiac index, lactate, and pH (9). In 1970, the introduction of the flow-directed balloon-tipped catheter by Swan et al. (10) accelerated interest in the bedside titration of therapy to optimize hemodynamics. Invasive hemodynamic monitoring became very popular in critically ill patients as hemodynamic and oxygen transport variables were readily available and could be repeatedly measured. In the following decade, researchers noted that failure to maintain high oxygen delivery and cardiac index was strongly predictive of adverse outcome from many surgical and medical conditions (11). Randomized clinical trials, based on hemodynamic optimization and supranormal oxygen delivery, were published with somewhat conflicting results and great controversy (12–14).

In 1995, Gattinoni et al. (15) published a multicenter randomized clinical trial evaluating the strategy of supranormal oxygen delivery values compared with normal values of central venous saturation (ScvO₂) and a standard care for a critical-care mixed population. In this study, no differences in morbidity or mortality were observed. This was a major blow at the supranormal end points proposed by Shoemaker et al. (14) for high-risk surgical and septic patients (15). A subsequent meta-analysis reported that only early interventions, with fluid resuscitation and optimization of hemodynamic variables, were associated with increased survival rates (16). It was not until the next decade that significant evidence would

Address reprint requests to Fernando A. Bozza, MD, PhD, Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365-C/237, 21040-360, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: bozza.fernando@gmail.com.
DOI: 10.1097/SHK.0b013e3181c76668
Copyright © 2010 by the Shock Society

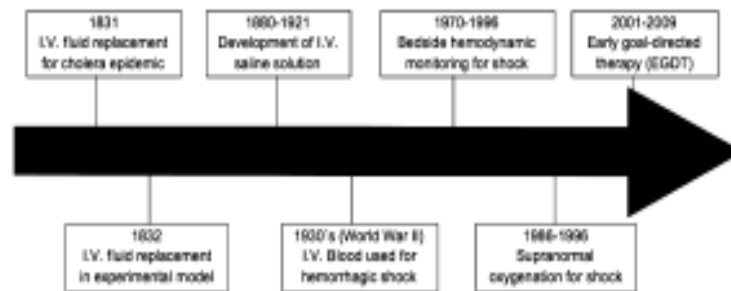


FIG. 1. Timeline of critical events of fluid replacement for shock patients.

bring fluid resuscitation and hemodynamic optimization back into the spotlight.

THE CURRENT EVIDENCE

In the last 10 years, the only randomized controlled trial (RCT) that addressed fluid replacement and restoring tissue perfusion in sepsis was published by Rivers et al. (17) and is known as the early goal-directed therapy (EGDT) trial. The remaining evidence is provided by observational studies with different designs (e.g., prospective or retrospective cohorts, pre-interventional and post-interventional observations). Early goal-directed therapy comes forward as a protocol aiming to restore hemodynamics and surrogate markers of tissue perfusion in patients with early severe sepsis and septic shock in the emergency department. The key factors proposed for the success of this intervention were the early identification of patients with sepsis associated with hypoperfusion and prompt initiation of therapy, based on a complex treatment algorithm (Fig. 2). All the steps should be accomplished in the initial 6 h. In this seminal study, patients assigned to EGDT received significantly

more fluids, packed red blood cell transfusions, and inotropes during the initial 6 h as compared with those assigned to standard therapy. However, during the next period of 7 to 72 h after admission, patients assigned to standard therapy received more fluids, red blood cell transfusion, and vasopressors. Early goal-directed therapy resulted in reduced rates of organ dysfunction and hospital mortality (30% vs. 46%) (17). In addition, EGDT also reduced the hospital length of stay (18.4 vs. 15.7 days) and costs (at an average of US \$9,346.60 per patient) (17). Recent data from the same trial also showed a positive correlation between organ dysfunction and biomarker levels (18). Lower levels of cytokines, markers of apoptosis and endothelial activation, such as TNF- α , IL-1ra, caspase-3, and ICAM-1, were observed 72 h after implementation of the EGDT (18).

POST-EGDT: OBSERVATIONAL STUDIES

Several approaches to implement EGDT have shown positive results. Management by the emergency department personnel, by rapid response teams, or by emphasizing quick transfer from the initial location to the intensive care unit are some of the

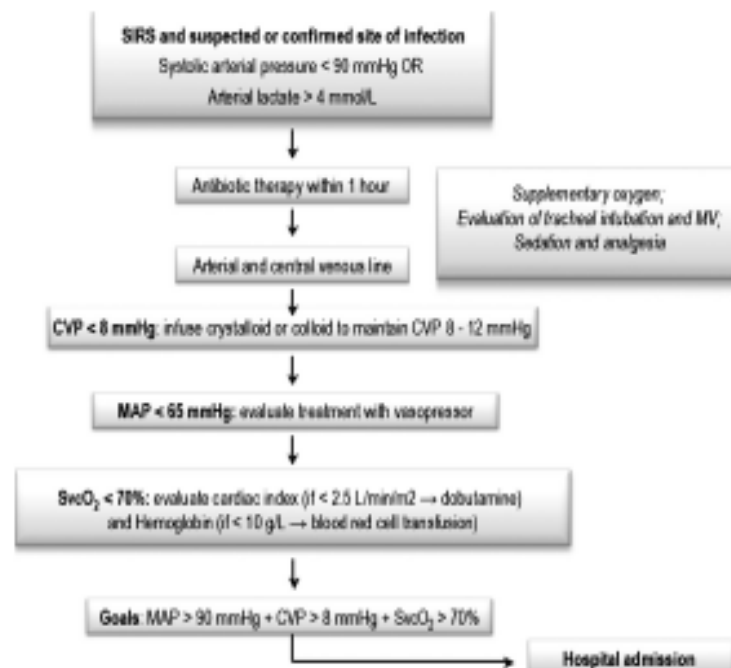


FIG. 2. Algorithm for the implementation of EGDT. SIRS indicates a systemic inflammatory response syndrome; MV, mechanical ventilation; CVP, central venous pressure; SvO_2 , central venous oxygen saturation.

proposed models of EGDT strategy implementation (19–21). Recently, Rivers et al. (22) conducted a systematic review of the literature on this issue. The search terms used included “bundles,” “early goal-directed therapy,” “hemodynamic optimization,” “protocols,” “resuscitation,” “sepsis,” “severe sepsis,” and “septic shock.” Twelve peer-reviewed publications including the original EGDT trial were identified since 2001. These studies consisted of historical control subjects versus patients prospectively examined after bundle implementation, prospective control patients before and after receiving EGDT implementation, patients who received the resuscitation bundle versus those who did not complete the bundle, and prospectively randomized control subjects versus treatment patients. The authors reported significant reduction in mortality rates (mean relative and absolute risk reduction of $0.47\% \pm 0.19\%$ and $21\% \pm 9.9\%$).

POTENTIAL MECHANISMS TO EXPLAIN THE BENEFITS OF EGDT

A recent meta-analysis showed that resuscitation strategies are diverse across clinical trials, but early septic patient resuscitation is associated with positive impact on mortality (23). There are several proposed mechanisms to explain the benefits of fluid replacement in early sepsis. Severe tissue hypoxia is a frequent pathophysiological abnormality in severe sepsis. A major imbalance in the supply/demand for oxygen at tissue level is associated with increased inflammatory response, higher concentrations of proinflammatory cytokines, mitochondrial dysfunction and endothelial activation, and, ultimately, organ failure and death (24, 25). Despite having an interesting rationale, data supporting a major mortality benefit of fluid replacement aiming at reversal of tissue hypoxia are scarce. Dorrestijn et al. (26) have demonstrated a protective effect of fluid replacement in an experimental model of endotoxemia, which correlates to a decrease in inflammation. Furthermore, recent data on patients enrolled in the original EGDT trial corroborate this hypothesis. It would be extremely helpful to confirm findings of improvements in biomarker concentrations and organ hypoxia in EGDT patients in future trials (18).

CURRENT RECOMMENDATIONS, LIMITATIONS, AND CONTROVERSIAL ASPECTS

Since its first publication, the Surviving Sepsis Campaign suggested that an acute resuscitation bundle should be followed on the first 6 h of diagnosis of severe sepsis. In the 2008 guidelines, using the GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation) system, EGDT was highly recommended despite the recognition that the evidence was only level C. Furthermore, the guidelines focused only on the general principle that vigorous resuscitation to avoid prolonged hypoperfusion would be a good strategy. The guidelines did not support use of central venous oxygen monitoring or the actual EGDT protocol used by Rivers et al. (27). Despite that early and vigorous fluid replacement is widely recognized as good clinical practice, EGDT has faced significant criticism (28, 29).

One of the major challenges for the implementation of EGDT is related to its protocol (Fig. 2). The protocol is com-

plex and should be implemented very early. It is also dependent on an expensive technology for the continuous monitoring of $Scvo_2$, which is certainly a barrier to its universal adoption. Even after significant training and educational efforts, there is evidence that full implementation of EGDT remains poor (9%) (30). Moreover, some of the steps of the protocol, such as the use of packed red blood cells and inotropes, are not universally accepted. Both transfusion and the use of inotropes have been previously associated with increased morbidity in critically ill patients (31). Also, the pursuit of a $Scvo_2$ greater than 70% may not be feasible or necessary. A recent study suggested that only a few patients presenting with severe sepsis have low $Scvo_2$ (32), and there is a large controversy over the use of $Scvo_2$ as a surrogate of tissue hypoxia (13).

Another concern related to the somewhat high mortality rate of 46% in the control group. This rate is much higher than that reported in many contemporary severe sepsis trials, raising concern that the control group may not have been truly representative. Another interesting aspect is related to a potentially iatrogenic intervention in the control arm that received more fluids in a later stage of sepsis, an intervention associated with increased morbidity and mortality (33, 34). A recent prospective multicenter cohort study showed that the mortality rates in Australia and New Zealand are 27% for patients with severe sepsis with no specific EGDT protocol (35). The authors claim that the impact of EGDT on mortality may be just the effect of organization and ease of access to a high-quality health system.

Taking all these factors into consideration, confirmatory multicenter studies are needed to validate the study of Rivers et al. and to put at rest the majority of the controversial aspects of the EGDT. To date, no other RCT evaluating an EGDT approach to severe sepsis was performed. However, several observational studies have been published in the past years. Most studies had a preintervention and postintervention design. However, in most studies (5/7), the other interventions such as glycemic control, activated protein C, and corticosteroids were introduced along with EGDT. Most studies showed improved hospital survival rates. Nonetheless, a significant bias cannot be ruled out in these studies as changes in practice may occur, reinforcing once more the need for new prospective RCTs in the field.

ONGOING TRIALS AND FUTURE DIRECTIONS

Despite the significant controversy in the EGDT subject, there is little question that aggressive and early fluid replacement in sepsis is “good clinical practice.” However, how aggressive and what is early are questions that still need to be adequately answered. As occurred with many of the Surviving Sepsis Campaign recommendations, EGDT has been translated into a highly recommended practice very early (36), perhaps without the required critical review (32). The evaluation of complex interventions such as EGDT demands a thorough study of both benefits and potential adverse effects associated with the intervention. Therefore, data obtained in large cohort studies must be prospectively validated in well-designed RCTs. Currently, three large government-funded RCTs are under way to validate EGDT: ProCESS (Protocolized Care for Early

Septic Shock [NCT00510835 at clinicaltrials.gov]), a US trial; ARISE (Australasian Resuscitation in Sepsis Evaluation [NCT00975793 at clinicaltrials.gov]); and ProMISE (Protocolised Management in Sepsis), a UK trial. These studies will be performed in different countries and are also designed to allow an analysis of pooled data, and a prospective individual meta-analysis is planned. All three trials are testing teams trained to deliver resuscitation and compare a team providing the full "Rivers EGDt protocol" with that providing "usual care." In addition, the US trial also has a third arm where the team also provides a simpler protocol without the blood, ScvO₂ monitoring and blood transfusions—the more controversial aspects of the original Rivers protocol. The three studies hope to address not only the clinical benefits, but also several pre-specified outcomes as the effects of resuscitation on key pathways implicated in the cause of organ dysfunction in sepsis. In addition, the studies will be tracking the costs and cost-effectiveness of team-based, protocolized resuscitation for severe sepsis. Considering the relevance of regional differences on the results of clinical trials, studies performed on developing countries would be necessary to validate the EGDt as a standard approach in this setting.

CONCLUSIONS

Almost 200 years after its initial clinical description, fluid resuscitation remains a controversial issue in the care of acutely ill patients. Recent advances in the pathophysiology of sepsis-related multiorgan dysfunction and on the impact of restoring tissue perfusion have provided the basis for protocols using physiology-based approaches to guide fluid therapy. This concept was tested both in observational studies and in a single-center RCT showing improved outcomes. However, to validate and translate this EGDt approach into standard of care, the results of ongoing multicenter trials are needed.

REFERENCES

1. Baskett IF: William O'Shaughnessy, Thomas Latta and the origins of intravenous saline. *Resuscitation* 55:231-234, 2002.
2. MacGillivray N: Dr Latta of Leith: pioneer in the treatment of cholera by intravenous saline infusion. *J R Coll Physicians Edinb* 3:680-85, 2006.
3. O'Shaughnessy WB: Proposal of a new method of treating the blue epidemic cholera by the injection of highly-oxygenated salt into the venous system. *Lancet* 17:366-371, 1831.
4. Latta TA: No. 3. Letter from DR. LATTA, of Leith, detailing three cases, of which one was successful. *Lancet* 18:370-373, 1832.
5. Latta TA: Saline venous injection in cases of malignant cholera, performed while in the vapour-bath. *Lancet* 19:208-209, 1832.
6. Awar S, Allison SP, Lobo DN: The history of 0.9% saline. *Clin Nutr* 27:179-188, 2008.
7. Bass AE: Multiple, progressive, or sequential system failure. A syndrome of the 1970s. *Arch Surg* 110:779-781, 1975.
8. Shires GT, Carton CJ, Coe D: The role of the extracellular fluid in shock. *Int Anesthesiol Clin* 2:435-454, 1964.
9. MacLean LD, Mulligan WG, McLean AP, Duff JB: Patterns of septic shock in man—a detailed study of 56 patients. *Ann Surg* 166:543-562, 1967.
10. Swan HJ, Ganz W, Permuter J, Marcus H, Diamond G, Chonens D: Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed balloon-tipped catheter. *N Engl J Med* 283:447-451, 1970.
11. Shoemaker WC, Appel PL, Kram HB: Hemodynamic and oxygen transport effects of dobutamine in critically ill general surgical patients. *Crit Care Med* 14:1032-1037, 1986.
12. Russell JA, Phang PT: The oxygen delivery system revisited: Approaches to management of the critically ill. *Am J Respir Crit Care Med* 149:533-537, 1994.

13. Ronco JJ, Fenwick JC, Tweeddale MG, Wiggs BR, Phang PT, Cooper DJ, Cunningham KP, Russell JA, Willey SC: Identification of the critical oxygen delivery to anaerobic metabolism in critically ill septic and nonseptic humans. *JAMA* 270:1724-1730, 1993.
14. Shoemaker WC, Appel PL, Kram HB, Bishop MH, Abraham E: Temporal hemodynamic and oxygen transport patterns in medical patients. *Septic shock. Crit Care* 10:41529-1536, 1993.
15. Gattinoni L, Brazzi L, Filadelfo P, Latini R, Tognoni G, Paoletti A, Parragalli R: A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. *Svo2 Collaborative Group. N Engl J Med* 333:1025-1032, 1995.
16. Boyd O, Bennett ED: Enhancement of perioperative tissue perfusion as a therapeutic strategy for major surgery. *New Horiz* 4:45-46, 1996.
17. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 345:1368-1377, 2001.
18. Rivers EP, Krae JA, Jacobson G, Shah K, Lomba M, Otero R, Childs DR: The influence of early hemodynamic optimization on biomarker patterns of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 35:2016-2024, 2007.
19. Trzeciak S, Dellinger RP, Abain N, Cowan RM, Statts M, Kilgusson JB, Zanotti S, Parrillo JE: Translating research to clinical practice: a 1-year experience with implementing early goal-directed therapy for septic shock in the emergency department. *Chest* 129:225-232, 2006.
20. Jones AE, Noth A, Horton JM, Kline JA: Prospective external validation of the clinical effectiveness of an emergency department-based early goal-directed therapy protocol for severe sepsis and septic shock. *Chest* 132:425-432, 2007.
21. Huang DT, Clement G, Drumstov TT, Angus DC: Implementation of early goal-directed therapy for severe sepsis and septic shock: a decision analytic. *Crit Care Med* 35:2080-2100, 2007.
22. Rivers EP, Coiba V, Whitwell M: Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock: a contemporary review of the literature. *Curr Opin Anaesthesiol* 2:128-140, 2008.
23. Jones AE, Brown MD, Trzeciak S, Shapiro NI, Garrett JS, Heffner AC, Kline JA: The effect of a quantitative resuscitation strategy on mortality in patients with sepsis: a meta-analysis. *Crit Care Med* 36:2734-2739, 2008.
24. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W: Multiorgan failure in an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet* 364:545-548, 2004.
25. d'Avila JC, Santiago AP, Amancio RT, Galina A, Oliveira MP, Borzari PA: Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med* 36:1925-1932, 2008.
26. Dorrestijn MJ, van Eijk LT, Netea MG, Smitz P, van der Hoeven JG, Pickkers P: Iso-osmolar polyhydration shifts the cytokine response towards a more anti-inflammatory balance in human endotoxemia. *J Endocrinol Res* 11:216-223, 2005.
27. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jauchin R, Reinhart K, Angus DC, Braun-Balton C, Beale R, et al.: Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 36:296-327, 2008.
28. Peri A: Bench-to-bedside review: the initial hemodynamic resuscitation of the septic patient according to Surviving Sepsis Campaign guidelines—does one size fit all? *Crit Care* 12:223, 2008.
29. Ho BC, Bellomo R, McLean P, Jones D, Naka T, Wan L, Braithwaite G: The incidence and outcome of septic shock patients in the absence of early-goal directed therapy. *Crit Care* 10:R30, 2006.
30. Ferrer R, Artigas A, Levy MM, Blanco J, Gonzalez-Diaz G, Garnacho-Montano J, Ibanez J, Palencia E, Quintana M, de la Torre-Prados MV: Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *JAMA* 299:2294-2303, 2008.
31. Hayes MA, Termino AC, Yan EH, Pakzro M, Hinds CJ, Walton D: Elevation of systemic oxygen delivery in the treatment of critically ill patients. *N Engl J Med* 330:1717-1722, 1994.
32. van Beest PA, Hofstra JJ, Schultz MJ, Bosman EC, Spronk PE, Kuzner MA: The incidence of low venous oxygen saturation on admission to the intensive care unit: a multi-center observational study in the Netherlands. *Crit Care* 12:R33, 2008.
33. Wisdomann HP, Whelan AP, Bernard GR, Thompson BT, Hayden D, deBorja E, Connors AF Jr, Hite RD, Harabin AJ: Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med* 354:2564-2575, 2006.
34. Vincent JL, Saller Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D: Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 34:344-353, 2006.
35. Peake SL, Bailey M, Bellomo R, Cameron PA, Cross A, Delaney A, Finfer S, Higgins A, Jones DA, Myburgh JA, et al.: Australasian resuscitation of sepsis evaluation (ARISE): a multi-center, prospective, inception cohort study. *Resuscitation* 80:811-818, 2009.
36. Dellinger RP, Carlet JM, Masni H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gomboladze J, Koh D, Marshall JC, Parker MM, et al.: Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 32:858-873, 2004.

