



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ronald de Albuquerque Lima

**Comparação do uso de noradrenalina, nitroprussiato e levosimendan na
terapia do choque hipovolêmico: efeitos sobre a microcirculação e
expressão gênica renal**

Rio de Janeiro

2014

Ronald de Albuquerque Lima

Comparação do uso de noradrenalina, nitroprussiato e levosimendan na terapia do choque hipovolêmico: efeitos sobre a microcirculação e expressão gênica renal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Ribeiro Villela

Coorientadora: Prof.^a Dra. Eliete Bouskela

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L732 Lima, Ronald de Albuquerque.

Comparação do uso de noradrenalina, nitroprussiato e levosimendan na terapia do choque hipovolêmico: efeitos sobre a microcirculação e expressão renal de genes relacionados à inflamação / Ronald de Albuquerque Lima. – 2014.

76 f.

Orientador: Nivaldo Ribeiro Villela.

Coorientadora: Eliete Bouskela

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Sangue – Circulação – Teses. 2. Microcirculação – Teses. 3. Choque hemorrágico – Teses. 4. Noradrenalina – Teses. I. Villela, Nivaldo Ribeiro. II. Bouskela, Eliete. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.993.161

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ronald de Albuquerque Lima

Comparação do uso de noradrenalina, nitroprussiato e levosimendan na terapia do choque hipovolêmico: efeitos sobre a microcirculação e expressão gênica renal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de maio de 2014.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Eliete Bouskela
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nivaldo Ribeiro Villela (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Daniel Alexandre Bottino
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Rieken de Macedo Rocco
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Nils Erik Svensjö
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá
Fundação Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo estímulo, dedicação e amor incondicional, ao qual sou eternamente grato.

À minha esposa Renata, por sua compreensão e infinita paciência durante minha constante ausência.

Aos médicos que despertaram em mim o apreço pela medicina e como praticá-la de maneira sincera e correta. Em especial ao Dr. Haroldo Coelho e à Dr^a Tânia Cortez.

À toda equipe do BioVasc, em especial à Eliane por sua inestimável colaboração.

Aos meus orientadores, professores Nivaldo e Eliete. Muito mais que orientação, me proporcionaram amizade, carinho e me mostraram o caminho a seguir na ciência. Terão sempre a minha lealdade e gratidão.

A imaginação é mais importante que o conhecimento

Albert Einstein

RESUMO

LIMA, Ronald de Albuquerque. *Comparação do uso de noradrenalina, nitroprussiato e levosimendan na terapia do choque hipovolêmico: efeitos sobre a microcirculação e expressão renal de genes relacionados à inflamação*. 2014. 76 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos sistêmicos, microcirculatórios assim como mudanças na expressão gênica renal, causados pela ação da noradrenalina, nitroprussiato de sódio e levosimendan no tratamento do choque hemorrágico. Nesse estudo foi utilizado o modelo da câmara dorsal. Os animais foram sujeitos a choque hemorrágico e após, foram aleatoriamente divididos em quatro grupos. Os grupos foram: CTRL, recebeu apenas ringer lactato; NPS recebeu ringer lactato com nitroprussiato de sódio; NA recebeu ringer lactato com noradrenalina e LEV, recebeu ringer lactato com levosimendan. Foram avaliados parâmetros sistêmicos, assim como parâmetros microcirculatórios (comparados como percentual em relação ao momento basal). Além disso, foi avaliada a expressão gênica renal de eNOS, HIF-1 α , ICAM e caspase-3. O grupo NPS apresentou uma recuperação sustentada do diâmetro arteriolar ($89 \pm 12\%$) e DCF ($125 \pm 114\%$) ao final do tratamento. Houve recuperação da velocidade de hemácias nos grupos CTRL e NPS. Não houve diferença em relação ao número de leucócitos aderidos e/ou rolantes ao final do tratamento. A expressão gênica renal de eNOS e caspase-3 entre os grupos não apontou diferenças, entretanto houve diferença significativa na expressão renal de HIF-1 α no grupo NA ($0,65 \pm 0,08$, UA) em relação ao grupo CTRL ($0,44 \pm 0,06$, UA) e LEV ($0,45 \pm 0,06$, UA). Todos os grupos tiveram uma maior expressão de ICAM ($0,65 \pm 0,12$; $0,7 \pm 0,12$; $0,069 \pm 0,06$; $0,65 \pm 0,12$, UA) em relação ao grupo SHAM ($0,50 \pm 0,05$, UA). Ringer lactato puro ou associado com noradrenalina ou levosimendan não foram suficientes para recuperar e sustentar os parâmetros microvasculares. O tratamento com nitroprussiato de sódio foi o que apresentou os melhores resultados, com recuperação dos diâmetros arteriolar, da DCF e velocidade de hemácias.

Palavras-chave: Fisiopatologia cardiovascular. Microcirculação. Câmara dorsal. Choque hemorrágico. Farmacologia cardiovascular.

ABSTRACT

LIMA, Ronald de Albuquerque. *Comparison between noradrenaline, nitroprusside and levosimendan use in hypovolemic shock therapy: effects on microcirculation and renal gene expression*. 2014. 76 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

This work aimed at evaluating the systemic and microcirculatory effects, as well as changes in renal gene expression elicited by noradrenalin, sodium nitroprusside and levosimendan associated to volume resuscitation in the treatment of hemorrhagic shock. The dorsal chamber model was used in this study. Animals were subjected to hemorrhagic shock and after that, were randomly distributed between four groups. Groups were: CTRL, received only lactated ringer's solution; NPS received lactated ringer's solution with sodium nitroprusside; NA received lactated ringer's solution with noradrenaline and LEV received lactated ringer's with levosimendan. Systemic and microcirculatory parameters were evaluated (as percent change compared to baseline). Furthermore, renal gene expression of eNOS, HIF-1 α and caspase-3 were also evaluated. NPS group presented a sustained recovery of arteriolar diameter (89 ± 12 %) and FCD (125 ± 114 %) at the end of the treatment. There was a red blood cell velocity recovery in CTRL and NPS groups. There was no difference regarding adhered or rolling leukocytes at the end of the treatment. eNOS and caspase-3 renal gene expression between groups showed no differences, however, there was a significant difference in renal gene expression of HIF-1 α in NA group ($0,65 \pm 0,08$, AU) compared to CTRL ($0,44 \pm 0,06$, AU) e LEV ($0,45 \pm 0,06$, AU). All groups had a higher expression of ICAM ($0,65 \pm 0,12$; $0,7 \pm 0,12$; $0,069 \pm 0,06$; $0,65 \pm 0,12$, AU) compared to the SHAM group ($0,50 \pm 0,05$, AU). Ringer's lactate solution associated or not to noradrenaline or levosimendan were not enough to recover and sustain microvascular parameters. Treatment with sodium nitroprusside presented the best results, with sustained arteriolar diameter, FCD and RBCV recoveries.

Keywords: Cardiovascular pathophysiology. Microcirculation. Dorsal chamber. Hemorrhagic shock. Cardiovascular pharmacology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição trimodal da mortalidade por trauma.....	14
Figura 2 –	Artérias,veias e as características de suas camadas.....	20
Figura 3 –	Estrutura da microcirculação.....	21
Figura 4 –	Relação entre a distância entre capilares e célula e difusão molecular...	22
Figura 5 –	Câmara de titânio.....	40
Figura 6 –	Hamster com câmara de titânio.....	40
Figura 7 –	Animal ao microscópio em tubo de restrição.....	41
Figura 8 –	Aspecto da câmara em pequeno aumento.....	41
Figura 9 –	Desenho experimental e linha do tempo.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Valores de pressão arterial média.....	47
Gráfico 2 –	Valores de hematócrito.....	48
Gráfico 3 –	Evolução do diâmetro arteriolar.....	50
Gráfico 4 –	Evolução do diâmetro venular	51
Gráfico 5 –	Evolução da DCF.....	52
Gráfico 6 –	Valores de velocidade de hemácias.....	53
Gráfico 7 –	Número de leucócitos rolantes na superfície endotelial.....	54
Gráfico 8 –	Número de leucócitos aderidos na superfície endotelial.....	54
Gráfico 9 –	Expressão gênica renal de eNOS.....	55
Gráfico 10 –	Expressão gênica renal de HIF - 1 α	55
Gráfico 11 –	Expressão gênica renal de ICAM	56
Gráfico 12 –	Expressão gênica renal de caspase-3.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Principais causas de mortalidade na subpopulação 15-44.....	13
Quadro 2 –	Principais causas de choque hemorrágico.....	17
Quadro 3 –	Classificação de choque hemorrágico de acordo com sintomas.....	18
Quadro 4 –	Composição de algumas soluções cristalóides disponíveis no mercado..	31
Quadro 5 –	Composição de algumas soluções colóides disponíveis no mercado.....	32
Quadro 6 –	Valores de gasometria arterial durante o experimento.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis of Variance
BE	Base Excess (Excesso de bases)
CO ₂	Dióxido de carbono
CTI	Centro de terapia intensiva
DAMP	Danger associated molecular pattern (padrão molecular associado ao perigo)
DC	Débito cardíaco
DCF	Densidade capilar funcional
DO ₂	Distribuição de O ₂
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase (sintase de óxido nítrico endotelial)
HCO ₃	Bicarbonato
HIF - 1 α	Hypoxia inducible factor - 1 α
ICAM	Intercellular adhesion molecules
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (sintase de óxido nítrico induzível)
NA	Noradrenalina
NPS	Nitroprussiato de sódio
ON	Óxido nítrico
OPS	Orthogonal polarized spectral imaging (imagem espectral com luz polarizada ortogonal)
PAM	Pressão arterial média
paO ₂	Pressão parcial de oxigênio
paCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
qRT - PCR	Quantitative real time PCR
RAGE	Receptor for advanced glycation end products (receptor para produtos de glicosilação avançada)
RL	Ringer lactato
SDF	Sidestream darkfield image
SDMO	Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos
TLR	Toll like receptor
UA	Unidades arbitrárias

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μm	Micrômetro
O_2	Oxigênio
g	Gramas
Na^+	Sódio
Cl^-	Cloro
K^+	Potássio
Ca^{++}	Cálcio
HCO_3	Bicarbonato
α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
Kg	Kilograma
\pm	Mais ou menos
n°	Número
mL	Mililitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	37
2	MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1	Descrição do modelo experimental	39
2.2	Divisão em grupos	42
2.3	Obtenção de dados sistêmicos	42
2.4	Obtenção de dados microcirculatórios	43
2.5	Análise de adesão e rolamento leucocitários	44
2.6	Expressão gênica renal	44
2.7	Análises estatísticas	46
3	RESULTADOS	47
3.1	Parâmetros sistêmicos	47
3.2	Diâmetro arteriolar	49
3.3	Diâmetro venular	50
3.4	Densidade capilar funcional	51
3.5	Velocidade de hemácias	52
3.6	Rolamento leucocitário	54
3.7	Adesão leucocitária	54
3.8	Expressão gênica renal de eNOS	55
3.9	Expressão gênica renal de HIF-1a	55
3.10	Expressão gênica renal de ICAM	56
3.11	Expressão gênica renal de caspase-3	57
4	DISCUSSÃO	58
	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67

INTRODUÇÃO

O TRAUMA E O CHOQUE HEMORRÁGICO

Veículos automotores cada vez mais velozes, utilização de maquinário pesado e armamentos com projéteis de alta velocidade fazem parte do cotidiano das sociedades modernas. À esses fatos, frequentemente somam-se outras variáveis como utilização de drogas e violência interpessoal. Esse encontro de organismos humanos com elementos de alta energia cinética, leva a lesões de órgãos densamente vascularizados e grandes vasos. O resultado final dessa equação são traumas complexos associados a hemorragias graves, com desastrosas consequências individuais e coletivas.

Uma verdadeira pandemia do mundo moderno, o trauma é responsável por uma considerável e crescente morbi-mortalidade na população brasileira (1) Muito além do impacto individual, o trauma é responsável por um impacto significativo na população economicamente ativa e deve ser tratado como um problema de saúde pública. Especificamente no Brasil, no ano de 2010, último ano registrado pelo SUS, houveram 143.256 óbitos e 929.245 internações notificados, ocasionados por causas externas (DATASUS).

Causa líder de morte na população entre 15-44 anos em países ricos, também figura como uma das principais causas de mortalidade em países mais pobres (2) (Quadro 1).

Quadro1- Principais causas de mortalidade na subpopulação 15-44 anos.

MORTALIDADE NA POPULAÇÃO DE 15-44 ANOS	
PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO	PAÍSES DESENVOLVIDOS
SIDA	<u>Acidentes de trânsito</u>
<u>Acidentes de trânsito</u>	<u>Lesões auto-infligidas</u>
<u>Violência interpessoal</u>	<u>Violência interpessoal</u>
<u>Lesões auto-infligidas</u>	Doença coronariana
Tuberculose	SIDA
Ferimentos de guerra	Cirrose hepática

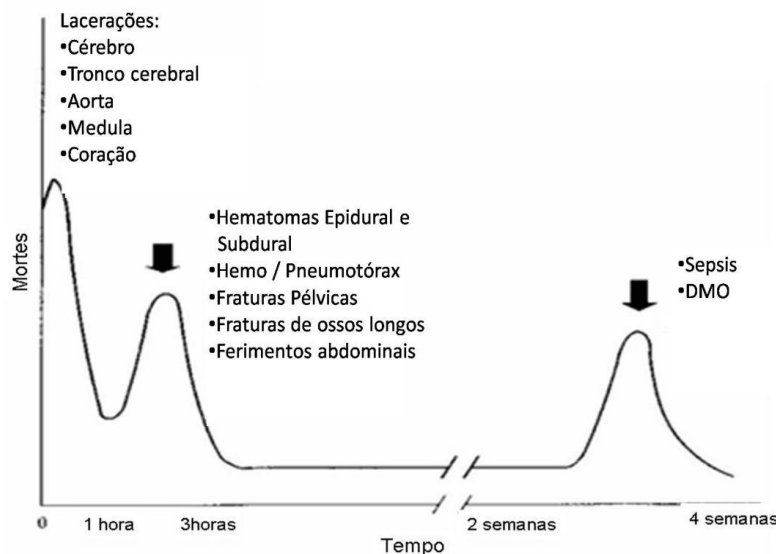
Fonte: WHO, 2014.

Esses óbitos podem ser classificados, de acordo com sua incidência em uma linha temporal iniciada após o evento traumático, em:

- 1) **MORTES IMEDIATAS** – Representam pacientes que morrem antes de alcançarem uma unidade hospitalar. As lesões que levam ao óbito são traumatismo crânio-encefálico ou medular grave e lesão vascular com exsanguinação imediata. Dificilmente seriam evitáveis, pois aproximadamente 60% desses pacientes morrem no momento da lesão.
- 2) **MORTES PRECOCES** – Ocorrem nas primeiras horas após o trauma. Aproximadamente metade é causada por choque hemorrágico e outra metade por lesões no sistema nervoso central (SNC). Praticamente todas essas lesões são tratáveis e a remoção imediata do paciente para um centro especializado em trauma pode reduzir essas mortes em 20%.
- 3) **MORTES TARDIAS** – Consiste de pacientes que morrem dias ou semanas após as lesões iniciais. Frequentemente de sepse e/ou disfunção de múltiplos órgãos.

Em países desenvolvidos, rápido atendimento pré-hospitalar, centros de trauma especializados e cuidados intensivos, tem mudado a clássica distribuição trimodal de mortalidade. Por outro lado, a morbi-mortalidade intra-hospitalar tardia por sepse e/ou Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) ainda afeta um número alto de pacientes e necessita de intervenções mais eficazes para combatê-las (3). (Figura 1)

Figura 1- Distribuição trimodal da mortalidade por trauma



Fonte: Doherty G., 2006, pág 208.

Uma vez que as mortes do primeiro pico são inevitáveis, para que possamos diminuir as mortes por trauma, é preciso concentrar os esforços no segundo e terceiro picos. Além de lesões no sistema nervoso central as hemorragias são causas frequentes de mortes evitáveis no segundo pico. De fato, todo indivíduo vítima de trauma é considerado como portador de hemorragia até que esta seja descartada. Presente em uma parcela importante dos pacientes politraumatizados, 40% das mortes relacionadas ao trauma são devido à hemorragia descontrolada e conseqüente choque hemorrágico (4). No campo de batalha, as mortes por choque hemorrágico chegam a 50% do total de soldados mortos (5). Mais preocupante ainda, o choque hemorrágico não leva ao óbito somente pacientes muito graves. O manejo inadequado da hemorragia em pacientes viáveis já foi identificado como uma importante causa de morte. (6).

Do total de pacientes que sobrevivem ao insulto inicial e recebem tratamento adequado em unidades hospitalares, entre 11 e 29 % desenvolvem a SDMO (7) , apesar dos melhores esforços envidados. Além da alta morbidade e custo hospitalar, a SDMO persistente carrega uma elevada mortalidade, especialmente quando atinge coração ou pulmões. Para evitar essas mortes, é necessário uma melhor compreensão de que maneira o choque circulatório, em especial o hemorrágico, apesar de adequadamente tratado, leva a disfunção orgânica.

O CHOQUE

O colapso cardiovascular ou síndrome do choque circulatório pode ser definido como a incapacidade do sistema cardiovascular em executar sua função primordial: a perfusão sanguínea de órgãos e tecidos (8). Essa síndrome clínica de origem variada, agrupa diversos processos fisiopatológicos que se manifestam em uma via comum: a hipoperfusão tecidual generalizada. Devido à essa diversidade, o choque circulatório é classificado de acordo com a sua etiologia:

1. Obstrutivo – por compressão do coração e grandes vasos;
2. Distributivo- por vasodilatação generalizada;
3. Cardiogênico – por perda da função de bomba cardíaca.
4. Neurogênico - por perda do tônus simpático
5. Hipovolêmico – por depleção do volume intravascular;

(9)

O CHOQUE HIPOVOLÊMICO

Ainda hoje, o choque hipovolêmico é o tipo mais comum de choque circulatório. De maneira menos freqüente, pode ser desencadeado por grandes extravasamentos de água do compartimento intravascular para o interstício. O aumento patológico da permeabilidade vascular pode levar a grandes movimentações de líquidos para cavidades, luz intestinal ou seqüestro em vísceras abdominais e em último caso, edema generalizado (10). A diminuição extrema do volume plasmático é o que, em última análise, conduz ao estado de choque (11). Mais frequentemente do que perda de água livre, o que leva a diminuição abrupta do volume circulante é uma perda de sangue total por hemorragia de vulto. Sua causa mais comum é a injúria traumática, causando hemorragia externa ou interna. Além do trauma, algumas condições clínicas e obstétricas também podem levar a perdas sanguíneas abruptas e volumosas (Quadro 2).

Quadro 2 - Principais causas de choque hemorrágico.

Causas de hemorragia e choque hemorrágico	Exemplos
Terapia anti-trombótica	
Coagulopatias	
Sangramento gastrointestinal	Varizes esofagianas Ruptura da junção mucosa Esôfago-gástrica Gastrite Úlceras gástricas e duodenais Câncer gástrico e duodenal Câncer colônico Doença diverticular
Obstétricas/ginecológicas	Placenta prévia Abruptio placentae Gravidez ectópica rota Cisto ovariano roto
Pulmonar	Câncer de pulmão Embolia pulmonar Doença pulmonar cavitária (tuberculose, aspergilose) Síndrome de Goodpasture
Ruptura de aneurisma	
Sangramento retro-peritoneal	
Trauma	Lesões penetrantes no tórax e abdome Lacerações Ruptura de grandes vasos

Fonte: Gutierrez, G., 2004.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO CHOQUE HEMORRÁGICO

Os sinais e sintomas da síndrome do choque circulatório são decorrentes da má perfusão tecidual e da acentuada resposta autonômica simpática que se acompanha. A gravidade do quadro clínico, de uma maneira geral, depende não somente do volume perdido, mas também da velocidade da perda e do estado clínico prévio do paciente. O ponto chave é o volume perdido em relação ao tempo. O sistema cardiovascular necessita de tempo para se

adaptar e produzir uma resposta compensatória adequada, mantendo uma função ao menos limítrofe por algum tempo. Perdas volêmicas pequenas durante longos períodos são portanto, mais bem toleradas do que grandes perdas de maneira abrupta.

De uma maneira geral, podemos classificar o choque hemorrágico de acordo com o volume sanguíneo perdido, a resposta fisiológica do paciente e suas manifestações clínicas correspondentes (Quadro 3). Embora essas tabelas classificatórias sejam úteis para uma estimativa inicial do paciente, é necessário ter em mente que variações individuais ocorrem. De acordo com a idade e gravidade de doenças preexistentes, pequenas perdas volêmicas podem levar o paciente a condições críticas (12).

Quadro 3 - Classificação de choque hemorrágico de acordo com sintomas

	CLASSE I	CLASSE II	CLASSE III	CLASSE IV
Perda sanguínea	Até 750 ml	750-1500 ml	1500-2000 ml	>2000 ml
Perda sanguínea	Até 15 %	15-30%	30-40%	> 40%
Frequência cardíaca	< 100 bpm	> 100bpm	> 120	> 140 bpm
Pressão arterial	Normal	Pequena diminuição	Diminuída	Significativamente diminuída
Pressão de pulso	Normal	Estreita	Estreita	Não aferível
Débito urinário	$\geq 0,5$ mL/kg	$\geq 0,5$ mL/kg	< 0,5 mL/kg	Mínimo
SNC/ estado mental	Levemente ansioso	Pouco ansioso	Ansioso e confuso	Confuso ou letárgico

Fonte: American College of Surgeons, 2008, pág 61.

Analisando os sinais e sintomas, o que se torna evidente é que a baixa perfusão tecidual e orgânica global leva a uma disfunção aguda em outros sistemas orgânicos. Isso acontece porque no curto prazo ocorre uma baixa oferta de nutrientes e principalmente oxigênio. Além disso, há um acúmulo de metabólitos tóxicos que deixam de ser carreados

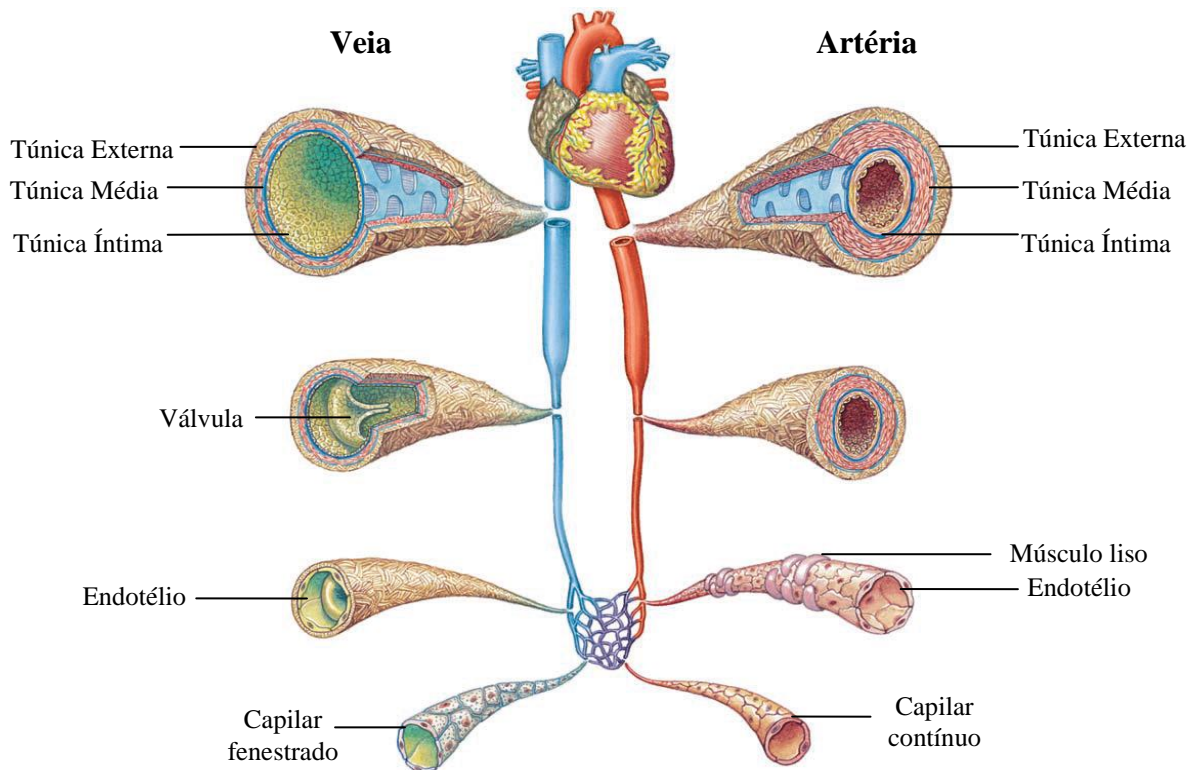
pela circulação (13). Para compreender melhor o que está ocorrendo, é necessário observar onde essas trocas efetivamente ocorrem: a microcirculação.

A MICROCIRCULAÇÃO

Desde a primeira descrição do sistema cardiovascular até poucas décadas atrás, o foco da observação científica estava voltado para o funcionamento da bomba cardíaca e a distribuição do fluxo sanguíneo através de grandes vasos. O pensamento dominante era que as etapas subseqüentes de oxigenação orgânica e retirada de produtos tóxicos dos tecidos seriam apenas uma consequência da distribuição sanguínea. De fato, durante séculos, o que acontecia entre o sistema cardiovascular e os tecidos eram apenas suposições. No início do século 20, uma nova evidência iria surgir e abrir caminho para o estudo de uma área, até então negligenciada do sistema cardiovascular. Em 1919, Krogh e cols. demonstraram que havia uma limitação da difusão do oxigênio através de um tecido (14). Esse fato chama a atenção para que os diferentes órgãos necessitam de uma rede de vasos, os quais distribuem a volemia através de seu parênquima. Para que esse aporte seja feito de maneira uniforme, é necessário uma regulação intrínseca, a qual redistribui o fluxo de acordo com as necessidades locais. Essa rede de diminutos vasos é onde efetivamente a regulação do fluxo para os tecidos e as trocas entre estes e o sangue acontecem.

Ao longo do sistema cardiovascular, a estrutura dos vasos sanguíneos é composta por três camadas. Uma camada adventícia, feita de tecido conjuntivo, uma camada média composta basicamente de musculatura lisa e uma íntima composta de um tipo celular fundamental para a estrutura e fisiologia vascular, a célula endotelial (Figura 2) (15). Partindo do coração, a árvore vascular arterial apresenta uma diminuição progressiva de seu calibre até atingir diâmetros microscópicos, quando então ocorre um aumento progressivo de diâmetro pelo sistema venoso, até o retorno ao coração. A composição das camadas é notavelmente constante até a chegada nos microvasos.

Figura2 - Artéria, veia e as características de suas camadas.



Fonte: Fox, 2011, pág 428.

A circulação do sangue através desses microvasos ou microcirculação tem como principais elementos os menores vasos do corpo: as arteríolas, vênulas e capilares. Arteríolas se caracterizam por possuírem uma camada muscular espessa, uma fina camada adventícia e um revestimento endotelial interno. Seu diâmetro varia entre 5 a 100 μm . Em sua parte terminal, arteríolas são denominadas metarteríolas, onde a camada muscular se torna irregular. Partindo das arteríolas ou metarteríolas, vasos de estrutura simples, compostos apenas por uma camada de células endoteliais e uma membrana basal podem se originar diretamente de arteríolas ou surgirem a partir de metarteríolas. Esses são denominados capilares e devido a seu diminuto diâmetro, esses vasos permitem a passagem apenas de hemácias alinhadas (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura da microcirculação.

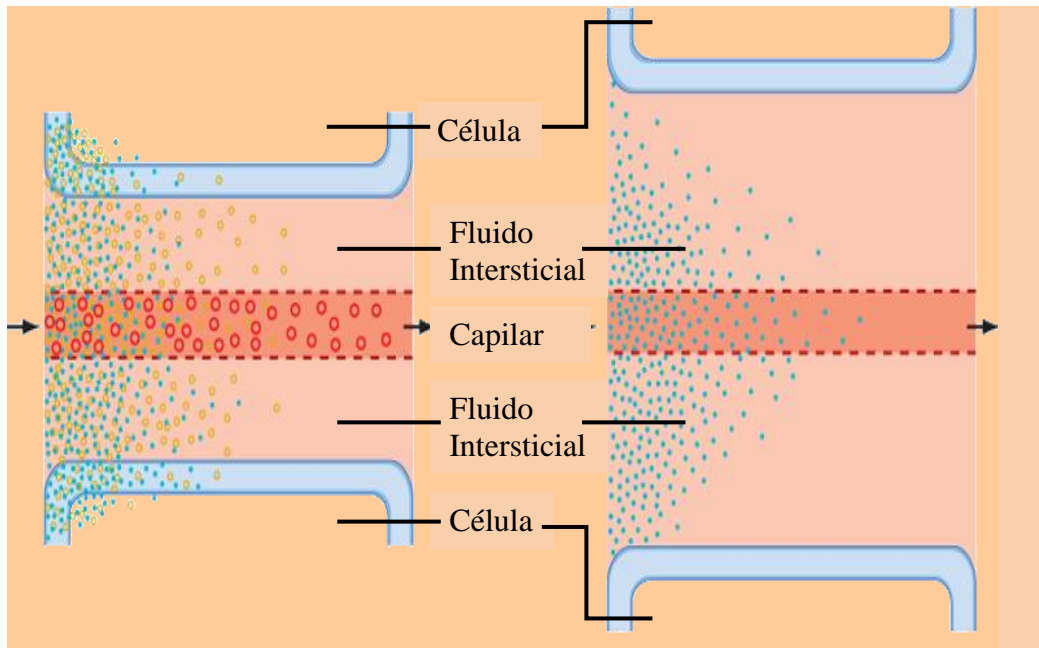


Legenda: As cabeças de setas na figura mostram arteríolas terminais dando origem a um grupo de capilares. Setas mostram esses capilares desembocando em vênulas.

Fonte: Seagal, S., 2005

A difusão de gases e nutrientes através especificamente desses microvasos é responsável pela manutenção da viabilidade dos tecidos. Quanto maior a distância entre um dado capilar e uma célula, mais difícil é a troca entre estes. Mais especificamente, ao observar um tecido, quanto menor a quantidade de vasos pÉrvios, com hemácias em movimento por uma dada área de tecido, maior é a distância que as moléculas tem que percorrer até a célula. Mais ainda, maior é a dificuldade de metabólitos serem removidos dos tecidos. Em termos práticos, quanto menor a densidade capilar funcional (DCF), definida como o comprimento de capilares pÉrvios (com hemácias em movimento em seu interior) por unidade de área tecidual, menor a chance do tecido manter-se adequadamente oxigenado, nutrido e viável (Figura 4).

Figura 4 - Relação entre a distância entre capilar e célula e difusão molecular.



Nota: Quanto maior a distância, maior a dificuldade de difusão molecular
 Fonte: Berne & Levy, 2008, pág

A OBSERVAÇÃO DA MICROCIRCULAÇÃO

A observação dos fenômenos que ocorrem na microcirculação compõem uma das últimas fronteiras do sistema cardiovascular. Apesar de sua primeira visualização ter sido detalhada por Leuwenhoek no século XVII, só passou a ser sistematicamente estudada depois da segunda metade do século XX. Entender melhor as trocas entre sangue e tecido, as interações celulares e moleculares nos vasos, assim como minimizar os processos patológicos que danificam essas delicadas estruturas, é a fronteira atual da fisiologia cardiovascular. Para tal, ao longo das últimas décadas foram desenvolvidos modelos experimentais e posteriormente métodos clínicos para que possamos tentar compreender os diversos mecanismos envolvidos.

Os modelos experimentais, especificamente os baseados na microscopia intravital, nos permitem observar diretamente a microcirculação tecidual, quantificar vasos, observar dilatações, vasoconstricções e número de capilares. Esses modelos são utilizados há mais de 40 anos, contribuindo de maneira inquestionável para o conhecimento do tema (16). Os mais diversos sítios anatômicos podem ser utilizados para a exposição da microcirculação. Na realidade, as descrições anatômico-fisiológicas mais importantes vieram de técnicas

intravitais desenvolvidas a partir de preparações de mesentério (17), cremaster (18) , a bolsa da bochecha no hamster (19), assim como pele e músculo, no caso da câmara dorsal (20). Até pouco tempo atrás, preparações intravitais precisavam ser muito delgadas para a obtenção de boas imagens. O advento da microscopia confocal de fluorescência abriu a oportunidade para a observação da microcirculação em tecidos espessos. Com isso, órgãos nobres como fígado (21) , rins (22), pulmões (23) e cérebro (24) também podem ser analisados, proporcionando a oportunidade de observar fenômenos diretamente na microvasculatura desses órgãos.

Em relação à pesquisa clínica, a observação da microcirculação em humanos já é uma realidade e é feita com equipamentos baseados em visualização direta ou detecção de fluxo. Dentre esses métodos, podemos destacar a videocapilaroscopia como uma ferramenta que já está deixando o território da pesquisa e se tornando parte do arsenal diagnóstico (25). Esse método baseia-se na observação dos capilares do leito ungueal. Em situações patológicas, vasos capilares apresentam alterações morfológicas e de fluxo facilmente observáveis. Os equipamentos baseados em absorção de luz ortogonal polarizada como o OPS (orthogonal polarized spectral light) e sua versão mais aprimorada, também baseada em luz polarizada, o SDF (sidestream darkfield image), encontraram grande aceitação na pesquisa clínica. Esses aparelhos baseiam-se na emissão de uma luz polarizada, posteriormente absorvida por moléculas de hemoglobina. Através de um sistema de microscopia móvel, esses instrumentos permitem a delimitação dos microvasos através da presença de hemácias, uma vez que não refletem a luz, aparecendo em preto em superfícies orgânicas. Desse modo, é possível a avaliação de diâmetros, verificar se estão pÉrvios e velocidade das hemácias no circuito (26). Softwares de análise automática estão sendo desenvolvidos, o que abriria espaço para monitorização contínua da microcirculação (27). Em outra vertente, o sistema laser-doppler, apesar de não visualizar diretamente os microvasos, detecta o fluxo sanguíneo microvascular e pode formar uma imagem da área (28). Esses modelos em conjunto, permitiram observar a anatomia da microcirculação e quantificar a microhemodinâmica. Mais que isso, permitiram correlacionar essas informações com dados macrohemodinâmicos, verificando se a manipulação de variáveis como pressão arterial, débito cardíaco ou resistência vascular periférica, está efetivamente se traduzindo em alterações do fluxo microvascular (29).

REGULAÇÃO DA MICROCIRCULAÇÃO

Com o intuito de manter um equilíbrio entre oferta e demanda de oxigênio e nutrientes nos tecidos, a perfusão de capilares deve responder às necessidades metabólicas de cada tecido. Para tal, a microcirculação conta com um conjunto de mecanismos auto-regulatórios para equilibrar oferta e demanda. Muitas das informações sobre regulação microcirculatória vem de estudos realizados em preparações intravitais de tecidos musculares (30-32) Esses modelos são uma inestimável fonte de informação, uma vez que a demanda tecidual é facilmente aumentada através de exercício ou seriadas contrações musculares. É importante ressaltar que assume-se o fato que os mecanismos regulatórios de fluxo nesses tecidos funcionam de maneira similar em outros leitos vasculares, entretanto há pouca evidência obtida através de observação direta.

Estudos pioneiros feitos Krogh e cols. demonstraram que existe uma rede de capilares maior que a necessária em repouso. Esses capilares extras podem ser recrutados em caso de aumento das necessidades metabólicas do tecido, mantendo um adequado suprimento de O₂ (14). Para isso, seria necessário uma estrutura anatômica que regulasse o fluxo na origem nos capilares e os mantivesse abertos ou fechados. Essa estrutura teórica denominada "esfíncter pré capilar" décadas atrás, denota uma regulação individual de cada capilar através de sua origem na arteríola. Notavelmente, essa estrutura individual nunca foi observada. Na realidade, evidências apontam que arteríolas terminais controlam o fluxo em um grupo de capilares (33). Assim, um novo conceito foi criado: o "esfíncter passivo". Nessa teoria, através da dilatação de uma arteríola terminal, o grupo de capilares que dela se originam, são recrutados através de um conjunto denominado unidade microvascular. Uma vez que a pressão sanguínea chega aos capilares, estes abrem-se passivamente pelo resultado da diferença entre transmissão de pressão e diferentes graus de resistência dos múltiplos capilares.

Existem diversos mecanismos propostos de controle local do fluxo sanguíneo, conhecida como auto regulação microcirculatória. O próprio fluxo sanguíneo basal, mantém uma força de cisalhamento sobre o endotélio é, *per se*, um estímulo à produção de óxido nítrico e manutenção do fluxo distal como será discutido a seguir. Um segundo importante mecanismo, a regulação através da demanda metabólica, foi descrito há décadas, baseado na observação de recrutamento capilar, devido principalmente à baixa concentração de O₂ (34). Em outra vertente, a hipótese miogênica surgiu de observações que demonstraram constrição arteriolar em vasos submetidos a pressões intravasculares aumentadas experimentalmente.

Esse mecanismo é um diferencial importante em órgãos estritamente auto-regulados como cérebro e rim, mantendo um fluxo relativamente constante em grandes variações de pressão arterial sistêmica (35). Não menos importante, a regulação neural tem um papel de destaque nos fluxos regionais. Arteriolas possuem inervação simpática e respondem à descarga de noradrenalina em suas terminações através de seus receptores α . Além de ser responsável por manter o tônus vascular durante o estado basal, atua através de descargas adrenérgicas durante situações patológicas, como no caso do choque hemorrágico (36). Outros mecanismos, sejam órgãos - específicos, como o feedback tubuloglomerular no rim ou outros menos elucidados, agem em paralelo. Assim como em outros sistemas de regulação fisiológica, diferentes vias de controle agem concomitantemente e sobrepujam umas as outras, dependendo da situação fisiológica que se apresenta.

O ENDOTÉLIO, A CÉLULA MUSCULAR LISA VASCULAR E SUA IMPORTÂNCIA NA REGULAÇÃO DO FLUXO MICROVASCULAR.

Pesando aproximadamente um quilo em um adulto médio, o conjunto de células endoteliais funciona como uma interface de comunicação entre o sangue e os tecidos. Esse tipo celular evita a coagulação secretando anticoagulantes, participa da inflamação produzindo citocinas e retendo quimiocinas, além de servir como ponto de ancoragem para as células inflamatórias (37). Visto apenas como um revestimento interno até a década de 1980, o tecido endotelial de fato é uma peça chave na regulação da microcirculação. Esta camada de células dentro dos vasos foi colocada em evidência quando Furchgott e colaboradores descobriram sua absoluta importância no processo de relaxamento da musculatura lisa vascular. A evidência da necessidade da presença do endotélio para sinalizar para a célula lisa muscular a necessidade do relaxamento, iniciou uma busca para definir o mecanismo (38). Ainda na década de 1980, o elemento sinalizador foi definido como o óxido nítrico (ON) (39). Esse gás altamente difusível e prontamente degradado, atua de maneira imediata no relaxamento da musculatura lisa vascular. Estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento em mecanorreceptores na superfície celular, mantém constante a produção de uma enzima constitutiva, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Em condições fisiológicas normais, o aminoácido L-arginina é utilizada como substrato para o ON (39, 40). Esse gás imediatamente se difunde para a músculo liso vascular, estimulando a enzima guanilato ciclase e defosforilando moléculas de GTP, as transformando em GMPc. Essa molécula, a qual funciona como um segundo mensageiro, sinaliza para a inibição da entrada de cálcio na

célula, retorno de cálcio para o retículo sarcoplasmático, ativa canais de K^+ , além de ativar uma quinase responsável por defosforilar a cadeia leve da miosina. Esses fatores em conjunto promovem o relaxamento do músculo liso e aumento do diâmetro vascular com consequente aumento do fluxo em determinado tecido.

Por outro lado, constrições arteriolares podem levar a diminuição da densidade capilar funcional e até mesmo interrupção do fluxo em determinada região. A contração da musculatura lisa presente nos vasos, depende de um mecanismo baseado no aumento da concentração intracelular de cálcio. Esse aumento é desencadeado após a estimulação de um receptor de membrana. Na célula muscular lisa vascular o ligante principal é a noradrenalina. Após a passagem do cálcio pela membrana e/ou uma liberação maciça pelo retículo sarcoplasmático, a alta concentração desse íon forma um complexo com uma proteína intracelular, a calmodulina. Esse complexo ativa uma enzima, uma quinase da cadeia leve da miosina. Finalmente, a fosforilação dessas cadeias leva a formação de uma ponte com a actina, ocorrendo a contração da musculatura lisa vascular. Em condições normais, a moderação entre vasodilatação e vasoconstrição mantém o equilíbrio do fluxo microvascular entre regiões de maior ou menor demanda (Berne et al. 2010)

No caso do choque hemorrágico, a curto prazo, a mudança do metabolismo associada a uma diminuição de forças físicas que atuam sobre o endotélio, farão com que estas células desencadeiem uma resposta anormal. A partir disso, sinais patológicos são enviados para a célula muscular lisa vascular, provocando vasoconstrição acentuada e contribuindo sobremaneira para fisiopatologia do choque (41).

O ENDOTÉLIO E SEU PAPEL NA FISIOPATOLOGIA DO CHOQUE HEMORRÁGICO

O endotélio responde prontamente a estímulos patológicos. Uma vez que o fluxo e o estímulo nos mecanorreceptores diminuem, a coagulação é favorecida e o tecido do entorno entra em sofrimento, citocinas e quimiocinas são produzidas. Estas induzem a produção e expressão de moléculas de superfícies. Esse fenômeno, a ativação endotelial, é um processo vital para a manutenção da hemostasia, promovendo a coagulação e recrutando diferentes células inflamatórias em uma hierarquia temporal para tecidos lesados ou infectados. A extrema utilidade da ativação do tecido endotelial enquanto localizada, se torna extremamente deletéria quando sistêmica, uma vez que a resposta fisiológica sai de controle (42). A

ativação endotelial parece ocorrer devido a formação de espécies ativas de oxigênio e quando levada ao ponto da disfunção, pode alterar a regulação microvascular e produzir repercussões mais ou menos graves em diferentes órgãos (43). A produção de ON, nessas situações, é feita através de uma enzima induzível, a iNOS (óxido nítrico sintase induzível). Essa enzima é ativada basicamente através de estímulos patológicos, decorrentes principalmente, de uma resposta inflamatória exacerbada. Essa produção de ON, além de anormal, pode manter-se durante longos períodos, perpetuando e agravando efeitos deletérios (44).

Em paralelo, a sinalização através de radicais livres, mecanismo bastante utilizado pelas células, pode sair de controle causando efeitos devastadores nos tecidos. A mesma enzima responsável pelo funcionamento normal da microcirculação também pode em certas condições, contribuir para o agravamento do processo patológico (45). A ausência do cofator tetrahidrobiopterina ou ausência de l-arginina pode fazer com que a enzima eNOS produza superóxido ou peróxido de hidrogênio, espécies ativas de oxigênio capazes de reagir com diversos tipos de proteínas celulares e ocasionar disfunção celular. Além disso, a produção simultânea de NO e anion superóxido favorecem o aparecimento de um composto tóxico, o anion peroxinitrito (46). Em sistemas *in vitro*, o peroxinitrito é altamente reativo, podendo oxidar grupamentos sulfidríla, éteres, assim como nitração e hidroxilação de compostos aromáticos. Compostos esses, bastante presentes na tirosina, triptofano e guanina. Esses aminoácidos e bases possuem ampla distribuição em moléculas intra-celulares (47). Essas reações podem facilmente contribuir para o processo. Na verdade, talvez a produção de peroxinitrito e não a de NO, seja um dos grandes responsáveis pela disfunção celular e orgânica que se segue após o choque hemorrágico. Zhao e cols. demonstraram que esse composto tem papel importante no período tardio do choque hemorrágico, onde há uma refratariedade às tentativas de ressuscitação (48)

Há controvérsias em relação à sequência de fenômenos que conduzem à disfunção orgânica. Apesar do contínuo debate, alguns eventos encontram um relativo consenso entre os cientistas. O baixo fluxo sanguíneo levando a hipóxia tecidual e acúmulo de metabólitos, ativação endotelial, microtromboses vasculares, adesão e infiltração leucocitária e finalmente, oclusão microvascular. É necessário intervir precocemente e abortar o mais cedo possível o ciclo de lesão endotelial e tecidual, oclusão microvascular e perda de DCF. A origem dessa afirmação está em estudos experimentais. Estes demonstraram que a demora na instituição da reposição volêmica leva a uma acentuação da resposta inflamatória e morte tecidual (49, 50). A contínua perda da DCF contribui sobremaneira na espiral descendente de mais lesão

tecidual e disfunção. Para interferir nesse processo fisiopatológico, contamos com um conjunto de medidas terapêuticas que visam restabelecer o fluxo microvascular e as trocas entre sangue e tecidos.

TERAPIA DO CHOQUE HEMORRÁGICO

A abordagem do paciente vítima de trauma e choque é complexa. A fim de aumentar as chances de sobrevivência, o tratamento inicia-se antes da chegada no hospital com a equipe de resgate, continuando na sala de emergência, centro cirúrgico e unidade de terapia intensiva. Alguns cuidados são comuns a qualquer paciente grave, como controle de via aérea e ventilação, acessos venosos e monitorização de sinais vitais. Outros cuidados são particulares ao paciente de trauma, como proteção de feridas e vísceras e estabilização de fraturas. Como evidenciado anteriormente, particularmente importante é o diagnóstico de choque circulatório. Uma vez estabelecido que o choque é de origem hemorrágica, o tratamento é iniciado imediatamente. Esses pacientes comumente iniciam a terapia ao mesmo tempo em que estão sendo investigados a procura dos sítios hemorrágicos. Para aumentar as chances de sobrevivência desses indivíduos, é preciso que algumas diretrizes de tratamento sejam seguidas. Existem cinco objetivos básicos para guiar a terapia: 1 Controlar o sítio hemorrágico; 2 Restabelecer o volume circulante; 3 Restabelecer níveis adequados de carreadores de oxigênio; 4 Controlar a coagulação; e 5 Manter parâmetros hemodinâmicos.

CIRURGIA DE URGÊNCIA E DAMAGE CONTROL SURGERY

Pacientes com necessidade de cirurgia urgente para controle de choque hemorrágico, naturalmente apresentam alta morbi-mortalidade. Em se tratando de lesões simples, essas são reparadas imediatamente pelo cirurgião de trauma. Por outro lado, comumente vítimas de trauma apresentam lesões hemorrágicas complexas em diversos sítios. Até meados da década de 1980, esses pacientes apresentavam elevada mortalidade intra-operatória ou pós-operatória imediata, uma vez que os cirurgiões insistiam em realizar longos e complexos procedimentos de reparo em pacientes visivelmente a beira da exaustão fisiológica .

Nesse período, começou a ser incorporado na cirurgia de trauma um conceito da Marinha denominado "damage control" ou controle de dano. Em um navio em situação de combate, equipes de controle de dano atuam fazendo reparos rápidos e paliativos, além de combater focos de incêndio. Isso é feito para que o navio continue com potencial de combate,

ou pelo menos garantindo sua fluutuabilidade até que os reparos definitivos possam ser feitos fora da situação de ataque.

A idéia dessa abordagem em cirurgia de trauma, é identificar pacientes que estão em exaustão fisiológica. Pacientes com coagulopatia grave, hipotensão refratária e sinais de hipoperfusão global grave como lactato arterial alto e acidose, apesar da ressuscitação volêmica. Após seleção, esses pacientes são submetidos à cirurgia paliativa, tamponando vísceras sangrantes com compressas, removendo vísceras ocas perfuradas em fundo cego e realizando bypasses temporários em eventuais lesões de grandes vasos. O tempo cirúrgico é curto, em geral aproximadamente uma hora. Os pacientes são então encaminhados para UTI e compensados clinicamente. Quando estão com parâmetros hemodinâmicos e de coagulação mais adequados, retornam ao centro cirúrgico para o procedimento definitivo (51). Apesar de carregarem uma grande morbidade e alto custo, essas técnicas apresentam menor mortalidade em relatos de casos e séries (52).

REPOSIÇÃO DE CARREADORES DE O₂ E CONTROLE DA COAGULAÇÃO

Um ponto crítico no tratamento do choque hemorrágico é manter a capacidade de oferta de oxigênio aos tecidos. É descrito na literatura que em humanos saudáveis, uma distribuição de O₂ abaixo de 7,3 mL · Kg · min⁻¹ (53) favorece a mudança de metabolismo de aeróbio para anaeróbio. Em pacientes sob intenso estresse metabólico, seria coerente manter esse valor acima disso, se possível. Atualmente, a oferta de células vermelhas é feita através de um concentrado de hemácias. A reposição de hemácias concentradas com quantidades insignificantes de plasma traz efeitos indesejados. Em pacientes traumatizados e vítimas de choque hemorrágico, um sistema de coagulação sob alta demanda associado a uma infusão maciça de concentrados de hemácias e outros líquidos leva a uma grave coagulopatia, que pode perpetuar o sangramento. Para impedir esse processo, transfusão de plasma e concentrado de plaquetas são indicados. A hemoterapia transfusional por sua vez, acarreta consequências. Maior risco de disfunção orgânica, maior tempo de internação na UTI e maior mortalidade (54). A partir da observação desses desfechos, normalmente o risco- benefício é pesado e transfusões são restritas para pacientes com baixa DO₂. Em geral, com níveis de hemoglobina abaixo de 7g/dL.

A partir do consenso que transfusões carregam um risco associado, houve uma iniciativa da indústria farmacêutica em criar soluções baseadas em carreadores de oxigênio. A

solução, em princípio engenhosa, de repor volume e carreamento de oxigênio ao mesmo tempo, infelizmente não obteve êxito. A primeira geração desses compostos absolutamente fracassou em ensaios clínicos. Maior mortalidade e aumento de incidência de insuficiência renal, foram alguns desfechos que levaram a não liberação para uso clínico desses compostos (55, 56). Atualmente existe uma segunda geração de compostos em teste, a qual se propõe a ser primariamente adjuvante no tratamento, ao invés de substituir o uso de hemácias.

Tão importante quanto fornecer transportadores de oxigênio e elementos de coagulação, é mantê-los circulando através da microcirculação (57). Frequentemente, pacientes não atingem critérios para a transfusão ou já estão recebendo múltiplas transfusões e ainda assim necessitam expandir o volume plasmático. Para esses indivíduos, uma variedade de opções baseadas em soluções cristalóides ou colóides para a reposição volêmica pode ser utilizada .

REPOSIÇÃO VOLÊMICA

Existem diversos tipos de soluções e concentrações de solutos para reposição volêmica. Independentemente de qual seja, a idéia da terapia é expandir o volume plasmático e manter a circulação sanguínea. Essas soluções são classificadas em dois tipos, dependendo de seu soluto.

Soluções Cristalóides

As soluções de íons inorgânicos e moléculas pequenas dissolvidas em água são chamados de cristalóides. O soluto principal geralmente é cloreto de sódio e as soluções podem ser isotônicas, hipertônicas ou hipotônicas. Soluções a base de glicose geralmente não são utilizadas para reposição em choque hemorrágico devido a pequena quantidade de glicose ser rapidamente metabolizada, sobrando apenas água livre que se difunde rapidamente dos vasos pelos tecidos. No quadro 4 encontra-se a composição de alguns compostos.

Quadro 4 - Composição de algumas soluções cristalóides disponíveis no mercado.

Solução	Osmolaridade (mOsm/L)	Na ⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Ca ⁺⁺ (mmol/L)	Glicose (g/L)	HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	Lactato (mmol/L)	Energia (kcal/L)
Glicose 5%	252					50			400
Glicose 50%	2520					500			4000
NaCl 0,9%	308	154	154						
Solução de Ringer	309	147	156	4	2,2				
Solução de Ringer com Lactato	278	131	111	5	2			29	

Fonte: O autor, 2014.

Soluções Colóides

Um colóide é uma solução homogênea, não cristalina, consistindo de grandes moléculas ou partículas microscópicas de uma substância dispersas em um solvente. Essas partículas não depositam e não podem ser separadas por filtração ou centrifugação como uma suspensão como o sangue. No quadro 5 encontra-se a composição de alguns colóides.

Quadro 5 - Composição de algumas soluções colóides disponíveis no mercado.

Solução	Colóide	PM p (Da)	PM n (Da)	Grau de substituição	Na ⁺ mmol/L	Cl ⁻ mmol/L	K ⁺ mmol/L	Ca ⁺⁺ mmol/L
Gelafundin	Gelatina	30000	22600		154	125		
Hemacel	Poligelina	35000	24300		145	145	5,1	6,25
Voluven	Tetramido	130000	60000	0,4	154	154		
HAES	Pentamido	200000	60000	0,5	154	154		
Dextran	Dextran 70	70000	39000		154	154		

Fonte: O autor, 2014.

CRISTALÓIDES X COLÓIDES

A decisão sobre qual tipo de expansor plasmático deve ser utilizado encontra evidências controversas na literatura. Trabalhos experimentais favorecem, em geral, a utilização de baixos volumes de reposição. Relatam menor perda sanguínea (58), menos lesão pulmonar aguda (59), entretanto são inconclusivos em relação à sobrevida (60). Esse tipo de estudo também mostra algumas vantagens para o uso de colóides, apontando uma menor resposta inflamatória (61), menos lesão pulmonar (62) .

Um fator que poderia explicar os bons resultados experimentais pode ser a maior viscosidade dessas soluções. Cabrales e cols. demonstraram em vários trabalhos que há uma melhora da perfusão microvascular com soluções de maior viscosidade. De acordo com essas observações, manter a viscosidade seria um bom alvo terapêutico, uma vez que promoveria uma maior força de cisalhamento sobre endotélio e estimularia a produção natural de óxido nítrico (63-65). Segundo Paes da Silva e cols., a combinação de soluções concentradas, mantendo propriedades osmóticas e oncóticas, poderia viabilizar a restauração duradoura da função microvascular (66). Apesar do relato de bons resultados, soluções colóides apresentam conhecidos e potencialmente nocivos efeitos colaterais , como distúrbios de coagulação (67), reações anafilactóides (68) e insuficiência renal (69)

Controvérsias à parte, o que é incontestável, é que a reposição volêmica maciça não é inócua. Isso é especialmente verdade com cristalóides, onde os volumes infundidos para atingir determinadas metas terapêuticas são maiores. É fato que essa abordagem agressiva

tem o potencial de gerar grandes edemas, o que traz morbidades. O grande acúmulo de líquido intersticial nos órgãos pode levar a condições graves como síndrome compartimental abdominal, edema pulmonar, infecções de ferida operatória dentre outras (70).

Apesar de evidências favorecendo menores volumes, o ponto fundamental desses estudos seria destacar a superioridade de um tipo de fluido em relação ao outro em grandes ensaios clínicos. Lamentavelmente, essas análises não evidenciaram nenhuma superioridade clínica nem diminuição da mortalidade. Em duas revisões sistemáticas, uma publicada em 1999 (71) e outra recentemente em 2012 pela base Cochrane (72), a conclusão de ambos é de que não há evidência suficiente para indicar uma terapia em detrimento de outra. Talvez existam subgrupos de pacientes que se favoreçam de um tipo ou outro, considerando-se as propriedades físico-químicas das diversas soluções de reposição. Mais estudos são necessários para definir a questão.

Uma vez que não há evidências definitivas de superioridade de uma terapia em detrimento de outra, o ponto crítico que se destaca, é a necessidade de outras abordagens terapêuticas no tratamento do choque hemorrágico. É necessário estabelecer outras terapias para tentar minimizar o tempo de ventilação mecânica, internação e especialmente diminuir a mortalidade. Nesse contexto, a terapia com outras drogas cardiovasculares, além das tradicionais vasoconstritoras, pode ser útil.

A HIPOTENSÃO PERMISSIVA

Restaurar a pressão arterial a níveis normais pré hemorrágicos pode trazer consequências indesejadas. Essa abordagem, além de desconsiderar a resposta endócrina desencadeada pelo choque, requer um grande volume de colóides e/ou cristalóides, predispondo a coagulopatias ou agravando as já existentes. Além disso, leva a aumento da pressão hidrostática no vasos, podendo deslocar eventuais coágulos pré-formados e manter sítios hemorrágicos ativos. Na tentativa de evitar esses fatores agravantes, foi criado o conceito de hipotensão permissiva. Através de uma ressuscitação volêmica mais econômica, não objetivando o restabelecimento de níveis pressóricos normais, poderíamos em teoria promover uma melhor hemostasia. De fato, corroborando essas informações, diferentes estudos apontam menores taxas de complicações em pacientes submetidos a ressuscitação sob hipotensão permissiva (73) e aumento de sobrevivência em choque experimental (74, 75). Além disso, a observação de pacientes pós trauma e choque hemorrágico, demonstrou que apesar

de adequadamente ressuscitados e apresentarem parâmetros hemodinâmicos normais, esses pacientes podem apresentar uma disfunção microvascular que pode perdurar por até 72 horas. Esses pacientes receberam infusão de vasoconstritores e manutenção do alvo hemodinâmico em parâmetros normais, pode ter agravado a disfunção microcirculatória (76).

O USO DE DROGAS NO TRATAMENTO DO CHOQUE HEMORRÁGICO

Apesar das principais medidas clínicas no tratamento do choque hemorrágico serem o restabelecimento do volume intravascular e terapia com hemoderivados, em alguns pacientes essas medidas serão insuficientes ou prejudiciais. Em alguns indivíduos com hemorragia descontrolada, apenas a infusão de soluções se torna ineficaz para sustentar parâmetros macrohemodinâmicos e a perfusão tecidual. Além disso, está bem descrito na literatura médica os efeitos deletérios da ressuscitação volêmica agressiva. Edema pulmonar, cerebral ou de vísceras, levando a síndrome compartimental abdominal são condições potencialmente graves. À luz desses fatos, a associação com outras terapias se faz necessária, visando diminuir a infusão maciça de soluções e suas consequências. Uma vez que atualmente, o manejo desses pacientes é feito com base em objetivos macrohemodinâmicos, utilizamos amplamente drogas vasoconstritoras, com destaque para a noradrenalina e mais recentemente, a vasopressina. Entretanto, com o foco voltado para a microcirculação, é necessário rever esses conceitos. Durante a fase inicial do choque hemorrágico, a infusão indiscriminada de drogas vasoconstritoras, associada a uma resposta neuroendócrina exacerbada, com aumento de catecolaminas e vasopressina talvez seja redundante e promova uma exacerbada vasoconstrição arteriolar, com fechamento de leitos capilares. Para contrabalançar a intensa constrição arteriolar, talvez sejam necessárias drogas com um perfil diferenciado, as quais promovam a reabertura dos leitos vasculares. Para avaliar essa proposta, testamos drogas de ação cardiovascular com ação distinta, descritas a seguir.

LEVOSIMENDAN

O levosimendan age através da sensibilização das miofibrilas à molécula de cálcio ao invés de aumentar o influxo do íon. Esse efeito faz com que a força de contração do músculo cardíaco aumente o débito sem entretanto aumentar o consumo de oxigênio (77). Além disso, a droga diminui a resistência vascular periférica e também a pulmonar, diferentemente das catecolaminas (78). Essa ação particular favorece o uso em pacientes com insuficiência cardíaca aguda, especialmente as causadas por síndromes coronarianas. Existem estudos favorecendo o uso de levosimendan sobre a dobutamina em pacientes com descompensação cardíaca aguda (79, 80). Sareila e cols. publicaram um estudo sugerindo que a vasodilatação causada pelo levosimendan é independente da produção de ON (81). Esse fato poderia, em tese, ser benéfico, uma vez que agiria sobre uma outra via de vasodilatação, independente de ON. A droga parece também modular a atividade anti-inflamatória, inibindo a liberação de IL-6 (82). Em tese, a ação inotrópica e vasodilatadora da droga poderiam ter outras aplicações terapêuticas. O aumento do fluxo combinado a uma menor resistência periférica. A partir disso, sua utilização em quadros clínicos onde essas propriedades são desejáveis já vem sendo testada. Moreli e cols. testaram a aplicação da droga para a ressuscitação da microcirculação em pacientes com sepse. Em comparação com a dobutamina, o levosimendan aumentou a densidade de vasos perfundidos e diminuiu a heterogeneidade de fluxo no tecido observado (83). Esses resultados provêm uma base racional para o teste da droga em outras situações de baixo fluxo microvascular.

NITROPRUSSIATO DE SÓDIO

Potente vasodilatador arterial e venoso, o nitroprussiato é um doador de ON. Amplamente utilizado em emergências hipertensivas, é também utilizado em pacientes com insuficiência cardíaca refratária. Por ser um doador de ON, suas propriedades vem sendo extensivamente estudadas ao longo de várias décadas. Experimentalmente, a falta de ON gera um quadro hipertensivo associado a lesão renal (84). Mais ainda, trabalhos apontam a proteção de lesões de isquemia e reperfusão através da ação do ON (85). No campo da pesquisa clínica, as ações vasodilatadoras são utilizadas para inferir sobre a vasodilatação endotélio independente. Além disso, em concordância com a observação clínica prévia, a utilização do nitroprussiato melhorou o fluxo microvascular em pacientes com insuficiência

cardíaca congestiva (86). Em conjunto, esses estudos apontam o benefício da utilização da droga em estados constrictivos persistentes. Especificamente no tratamento de choque, a vasodilatação das arteríolas distais pode, em tese, promover uma abertura de unidades microvasculares e conseqüentemente melhorar a perfusão tecidual.

A NORADRENALINA

Fármaco atualmente de escolha em estados hipotensivos, a noradrenalina faz parte do grupo das catecolaminas e é produzida naturalmente pelas glândulas adrenais. Essa molécula faz parte da resposta adaptativa dos mamíferos e é normalmente integrante da fisiologia do sistema nervoso autônomo. Possui ação como neurotransmissor, além de ser o precursor imediato da adrenalina (87). Em relação ao estados de choque, tornou-se um fármaco altamente utilizado em CTIs e centros cirúrgicos devido à sua capacidade vasopressora e manutenção da pressão arterial em estados críticos de hipotensão (88).

Sua ação nesse sentido se dá através de receptores adrenérgicos, localizados em vários tecidos (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3). A atividade em receptores α_1 localizados nos vasos sanguíneos é responsável pela intensa vasoconstrição observada (89). Essa ação aumenta sobremaneira a resistência vascular, mantendo a pressão arterial em níveis razoáveis, muitas vezes, às custas de menor perfusão periférica. Fato decorrente muitas vezes de doses acima das necessárias (90). Devido a vasoconstrição ocorrer também em território venular, a noradrenalina possui a capacidade teórica de inicialmente aumentar o débito cardíaco, devido a recolocação desse volume sanguíneo circulante proveniente do território venoso. O fármaco também possui ação em receptores β_1 , entretanto não é um efeito clinicamente importante.

Historicamente, a noradrenalina tem sido usada para titular a pressão arterial de pacientes chocados. Apesar de amplamente utilizado, esse é um parâmetro pouco fidedigno para fazer inferências sobre a perfusão e oxigenação teciduais (91).

1 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar os efeitos sistêmicos, microcirculatórios e na expressão gênica renal de três drogas com diferentes perfis de ação no sistema cardiovascular e compará-las com a reposição volêmica pura. Levosimendan com perfil inotrópico vasodilatador, noradrenalina, que possui um perfil basicamente vasoconstrictor e nitroprussiato de sódio, com perfil basicamente vasodilatador.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

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

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

Após 5 a 7 dias, quando já desapareceram os efeitos dos traumas cirúrgico e anestésico, o animal foi novamente anestesiado, removida a pelagem da região cervical anterior e feita incisão longitudinal do lado esquerdo. Após isso, as camadas mais profundas foram dissecadas para permitir a exposição das artéria carótida e veia jugular interna. Os dois vasos foram abertos para inserção de cateteres. Estes foram utilizados para medição de PAM e retirada volêmica (carótida) e infusão volumétrica ou de drogas (jugular). O experimento foi realizado no dia seguinte. Durante os experimentos, o animal foi imobilizado em um tubo de acrílico com pequenos orifícios laterais para facilitar a respiração. A câmara de titânio fixada

no animal passa por uma saída transversal do tubo, permitindo a visualização da microcirculação ao microscópio pela janela transparente da preparação.

Foi utilizado um microscópio intravital da marca Zeiss-Axioskop (Göttingen, Alemanha), utilizando-se de transiluminação com lâmpada de mercúrio tungstênio-halogênio de 100W alimentada por fonte de 12V. Podemos ver nas figuras 5, 6, 7 e 8, o processo da montagem da câmara até a sua visualização em pequeno aumento. As análises microcirculatórias foram feitas através de software AxioVision (Jena-Alemanha), próprio do equipamento.

2.1 Descrição do modelo experimental

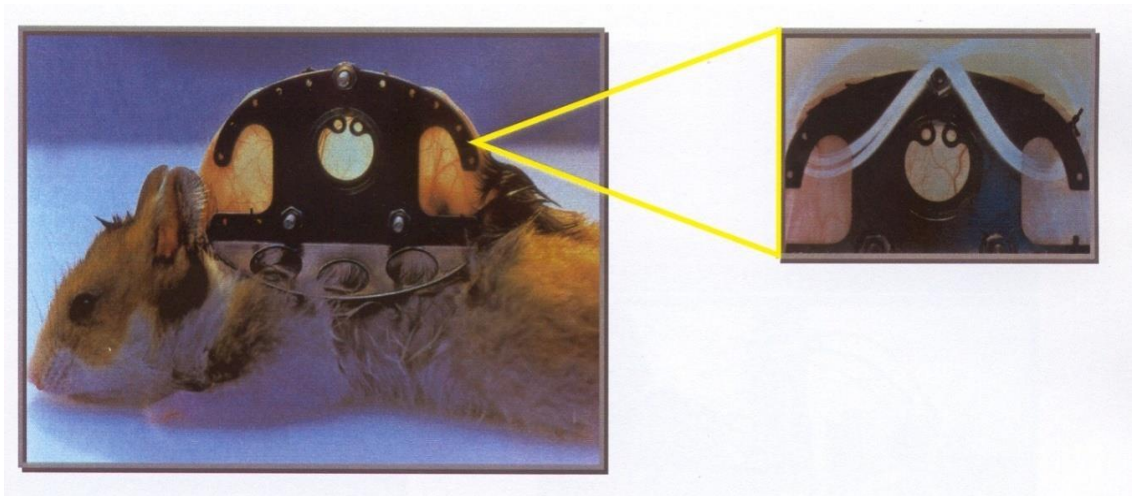
Após acomodação do animal ao microscópio, foi iniciado o primeiro ciclo de medidas nos animais, considerado como momento basal. Em seguida, foi realizado o choque hemorrágico através da retirada progressiva de volume sanguíneo até que fosse atingida a PAM de 40 mmHg. Após esse período, a fim de simular o transporte de um paciente até uma unidade de emergência e uma sala de cirurgia, foi aguardado o período de 60 minutos até o segundo ciclo de medidas. A PAM foi sustentada nesse valor durante esse tempo através de retiradas e/ou reinfusões de pequenos volumes sanguíneos. Após 60 minutos de manutenção do animal em hipovolemia, foi iniciado o tratamento com reposição volumétrica de duas vezes o volume retirado com solução de cloreto de Ringer Lactato durante um período de 10 minutos. Todos os animais receberam infusão contínua durante 90 minutos de solução de Ringer Lactato, no volume total de 1 mL, associada à droga em estudo. No grupo que recebeu apenas reposição volêmica, os animais receberam apenas a infusão da solução cristalóide durante 90 minutos. O volume da solução de infusão contínua (1 mL), foi descontado da reposição inicial, de forma que todos recebessem duas vezes o volume retirado. Dois ciclos de medidas foram realizados durante o tratamento, aos 60 e 90 minutos após o início da terapia (Figura 9)

Figura 5 - Câmara de titânio



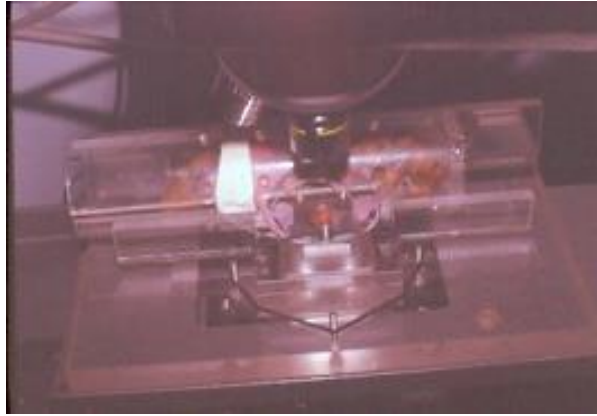
Fonte: BioVasc, UERJ, 2000.

Figura 6 - Hamster com câmara de titânio com detalhe da fixação do cateter e câmara.



Fonte: Microhemodynamics laboratory, UCSD, 1998.

Figura 7 - Animal ao microscópio em tubo de acrílico



Fonte: BioVasc, UERJ, 1998.

Figura 8 - Aspecto da câmara em pequeno aumento, demonstrando vênulas em maior calibre e arteríolas em menor calibre.



Fonte: Microhemodynamics laboratory, UCSD, 2000.

2.2 Divisão em grupos

O estudo envolveu 4 grupos, cada qual com 8 animais.

Grupo 1 (SF 0,9%, N = 8) - submetido ao choque hemorrágico e realizado reposição volêmica com solução de ringer lactato, com injeção de duas vezes o volume retirado de sangue durante 10 minutos. Estes animais receberam uma infusão de 1mL de ringer lactato puro durante 90 minutos, no lugar de uma droga.

Grupo 2 (Noradrenalina, N = 8) submetido ao choque hemorrágico e realizado reposição volêmica com solução de ringer lactato, com injeção de duas vezes o volume retirado de sangue durante 10 minutos, associado à infusão de noradrenalina na dose de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ por 90 minutos.

Grupo 3 (Nitroprussiato de Sódio, N = 8) submetido ao choque hemorrágico e realizado reposição volêmica com solução de ringer lactato, com injeção de duas vezes o volume retirado de sangue, associado à infusão de nitroprussiato na dose de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ por 90 minutos.

Grupo 4 (Levosimendan, N = 8) submetido ao choque hemorrágico e realizado reposição volêmica com solução de ringer lactato, com injeção de duas vezes o volume retirado de sangue durante 10 minutos, associado à infusão de levosimendan na dose de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ por 90 minutos.

Foram realizados três ciclos de medidas em momentos diferentes. As medidas analisadas são descritas a seguir:

2.3 Obtenção de dados sistêmicos

Hematócrito e gasometria arterial foram colhidos no momento basal, 60 minutos após o choque e 90 minutos após o tratamento. Esses dados foram obtidos apenas no final do tratamento para evitar nova retirada sanguínea após o início da infusão. Para a colheita do hematócrito, 0,1 mL foi retirado do animal, colocado em tubo capilar, centrifugado e feita a leitura. Para a análise gasométrica, foram colhidas amostras de sangue de 0,1 ml e colocadas em cartucho de análise do aparelho I-stat (Abbott laboratories, Illinois – USA), o qual forneceu os seguintes parâmetros: pH, BEx, lactato, paO_2 , paCO_2 , HCO_3 .

2.4 Obtenção de dados microcirculatórios

Para realizar as medidas microcirculatórias, em cada um dos quatro momentos do estudo (basal, 60 minutos após o choque, 60 minutos após o tratamento e 90 minutos após o tratamento) utilizamos dois campos para observação de arteríolas, dois para observação de vênulas e dez campos para observação de vasos capilares de cada animal. Os dados foram comparados em relação ao momento basal e plotados como percentual em relação ao basal.

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

Em cada um dos quatro momentos do estudo, foram obtidas fotos das arteríolas e vênulas e filmes dos vasos capilares

I -Campo arteriolar e II- Campo Venular:

No momento basal foram escolhidos os dois melhores campos para visualização concomitante de uma arteríola e uma vênula, as quais foram fotografadas sob aumento de dez vezes. A imagem dos mesmos vasos foi gravada nos momentos seguintes de estudo: após 60 minutos de hipovolemia e após 60 e 90 minutos da reposição volêmica, associada ou não ao tratamento farmacológico em infusão contínua.

III -Campos capilares:

Foram observados 10 campos distribuídos pela câmara. Após acomodação do animal ao microscópio, mediu-se o somatório do trajeto de capilares funcionantes no campo observado, ou seja, com hemácias circulantes por unidade de área. Para a medida da velocidade de deslocamento das hemácias, subjetivamente foi selecionado o capilar com melhor fluxo em 5 campos capilares de cada animal. Uma hemácia circulante foi marcada

nesse vaso e acompanhada no avanço de um quadro do filme da microcirculação gravado. A partir da distância percorrida no tempo de um quadro, foi aferida a velocidade.

2.5 Análise de adesão e rolamento leucocitários

Para a visualização da adesão e rolamento de leucócitos, foi utilizada a infusão de rodamina 10% na dose de 10mg/kg IV em “bolus”. A aplicação de rodamina para o impregnação dos leucócitos foi feita apenas após o término do experimento, para evitar a injeção de outras drogas durante o tratamento. Estes foram observados em microscópio através de filtro verde para transiluminação do núcleo leucocitário marcado e contagem dos leucócitos rolantes e dos aderidos à parede venular, em área delimitada, em campo previamente escolhido. Um filme de 30 segundos de duração foi feito de cada animal e analisado posteriormente no software AxioVision.

2.6 Expressão gênica renal

Para inferir sobre repercussões da hipoperfusão / tratamento em órgãos nobres, foi verificada a expressão gênica de algumas moléculas - chaves no rim ao final do tratamento. Para tal, um *set* experimental separado foi feito com a mesma linha de tempo experimental e os mesmos grupos, acrescentado de um grupo sham, no qual apenas a colocação da câmara foi feita (n=5 em cada grupo). Ao final, o rim foi extraído, processado e um feito PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) de moléculas envolvidas na fisiologia endotelial (eNOS), isquemia (hypoxia inducible factor 1 α - HIF-1 α), ativação endotelial (intercelular adhesion molecule - ICAM) e apoptose (caspase-3).

Isolamento de RNA Total

O RNA total foi extraído das células renais utilizando-se o kit de colunas RNeasy (Qiagen, Holanda) de acordo com o protocolo do fabricante. Posterior à extração, foi feito tratamento com DNase (Qiagen, Holanda) durante 15 minutos como um último passo para purificação do RNA. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e a razão da absorbância 260nm/280nm usadas para acessar a pureza das mesmas, aceitando-se razões

como ótimas as que estivessem, aproximadamente, no valor de 2. O RNA total das amostras foi, então, utilizado para PCR em Tempo Real (qRT-PCR).

PCR Quantitativo em Tempo Real

Para essa análise, foram desenhados primers específicos para hamsters:

HIF-1 α : sense 5'- TGTTTGGTGCTGATTTGTGA-3' e antisense 5'- GGTCAGATGATCAGAGTCCA -3';

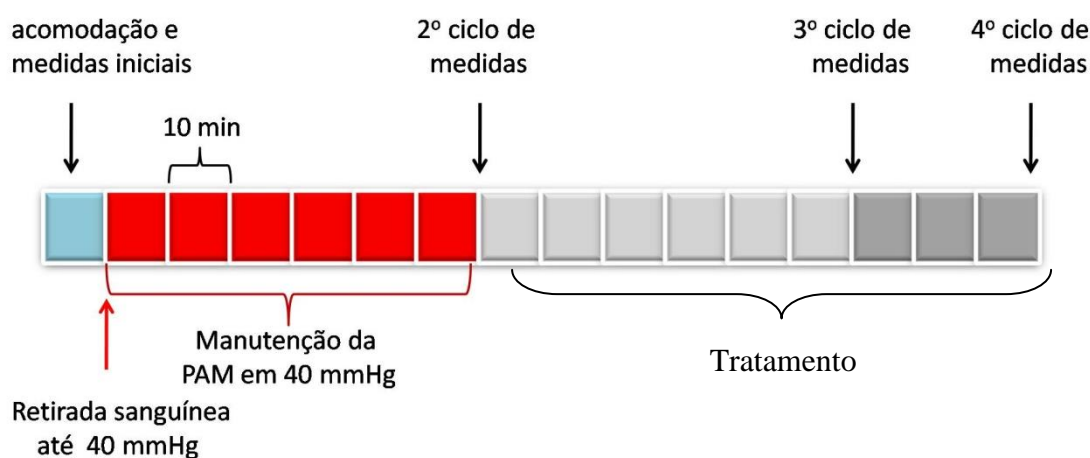
eNOS: sense FOW 5' TGCAGCAAAGGGCGCGGGTATCAC 3' e antisense REV 5' CCTTCACACGCTTGGCCATCACAGT 3';

ICAM-1: sense 5' CTTCATCACGATCCCAAGAG 3' e antisense 5' CCCTCTGTAGCTTGTATATC 3' e

caspase-3: sense 5' CCAAGTCACCACATGAGAAA 3' e antisense 5' GCATGCTTATAGACTCAGGAC 3'.

Para controle interno, foram utilizado primers para β actina de hamster: sense 5' GGCATCCACGAAACTACAT 3'- e antisense 5'- CAGTGATCTCCTTCTGCATC 3'. A transcrição reversa foi realizada com kit Superscript III (Invitrogen) utilizando RNA total das amostras obtendo-se, então, os DNAs complementares (DNAc). Em seguida, foram submetidos às reações em cadeia com SYBR Green (Qiagen, EUA) em Thermal Cyclor 7500 (Applied Biosystems, EUA) com os devidos ciclos: 15 minutos a 95° C, 40 ciclos de 15 segundos a 95° C, 30 segundos a 60° C e 35 segundos a 72° C. Os dados foram analisados no software 7500 System, versão 2.05 (Applied Biosystems, EUA). A expressão dos genes foi representada através da normalização dos dados pelo controle interno.

Figura 9 - Desenho experimental e linha do tempo.



Nota: Cada bloco equivale a 10 minutos. microcirculatórias. HTC e gasometria

Os ciclos de medidas se referem às medidas arterial foram dosados nos 1º 2º e 4º ciclos de medidas.

Fonte: O autor, 2014.

2.7 Análises estatísticas

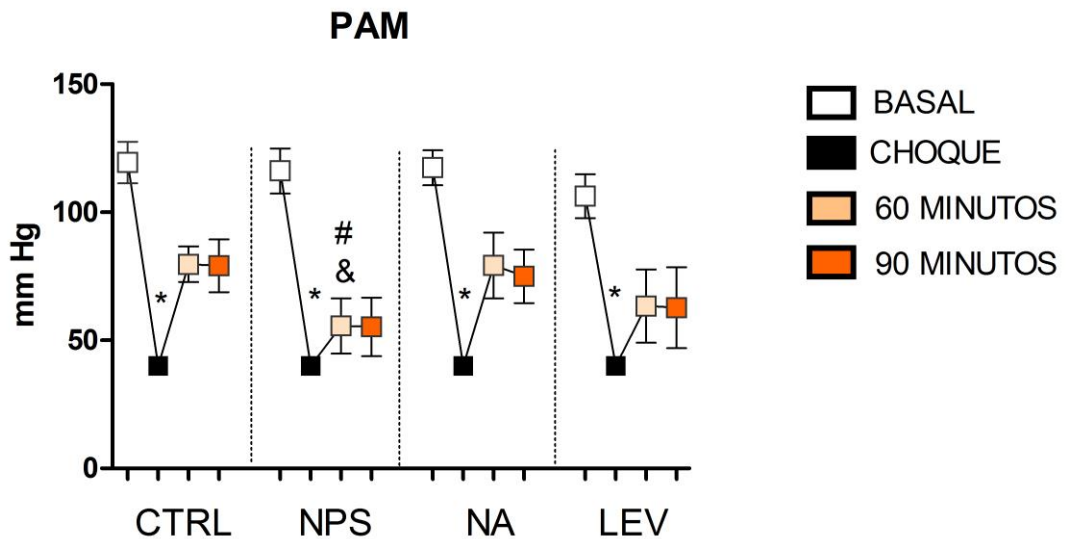
Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise estatística utilizando o software Prism 5 (Graphpad La Jolla, CA - EUA). Para análise dentro do mesmo grupo, foi utilizado o teste de Friedman e o teste de Dunn para comparações múltiplas. No caso de análise inter grupos, foi aplicado a ANOVA não paramétrica (teste de Kruskal - Wallis) juntamente com o teste de Dunn para análises múltiplas. Foram considerados estatisticamente significativos valores nos quais o nível de significância (p) foi menor que 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 Parâmetros sistêmicos

A pressão arterial apresentou queda, com diferença significativa em todos os grupos, após o choque. Em todos os grupos houve recuperação dos valores próximos aos níveis basais, não havendo diferença significativa entre os valores após os 60 e 90 minutos de tratamento dos valores basais. O grupo NPS apresentou uma diferença significativa em relação aos grupos CTRL e NA aos 60 minutos pós-tratamento. Gráfico 1.

Gráfico 1 - Valores de pressão arterial média e sua evolução ao longo do experimento.

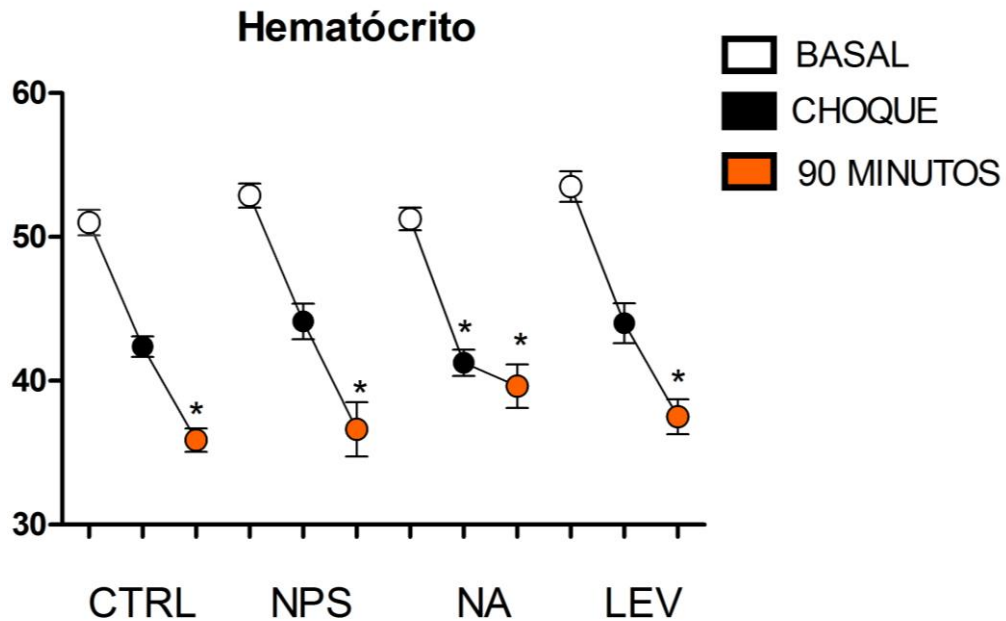


* p < 0,05 em relação ao momento basal. # p < 0,05 em relação ao CTRL aos 60 minutos.

& p < 0,05 em relação ao grupo NA aos 60 minutos.

O hematócrito apresentou queda progressiva em todos os grupos, com uma diferença significativa após os 90 minutos de tratamento em todos. O grupo NA obteve uma queda significativa após o momento do choque no hematócrito em relação ao momento basal, apresentando uma diferença estatisticamente significativa. Gráfico 2.

Gráfico 2 - Os valores apresentados mostram o hematócrito em três momentos. Basal, após o choque e no final do tratamento, aos 90 minutos de infusão.



Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao momento basal. CTRL -grupo controle, NPS - grupo nitroprussiato, NA - grupo noradrenalina, LEV - grupo levosimendan

Durante o período de choque, houve um aumento significativo da pO_2 em todos os grupos e o retorno aos níveis basais após o tratamento. Após 90 minutos de tratamento, o grupo NA apresentou uma diminuição significativa da pCO_2 em relação ao momento basal. Em relação ao pH, houve uma diminuição significativa no grupo NPS e NA após o choque. O grupo CTRL apresentou uma diferença significativa em relação ao momento do choque após o término do tratamento. O bicarbonato caiu significativamente em todos os grupos após o choque, recuperando-se aos níveis basais no grupo CTRL e LEV mas não no grupos NPS e NA. Os valores de BE caíram significativamente em todos os grupos, porém foram recuperados aos níveis basais. Os valores de lactato aumentaram significativamente em todos os grupos após o momento do choque, sendo recuperados a valores similares ao momento basal em todos os grupos após o choque. Quadro 6.

Quadro 6 - Valores de gasometria arterial durante o período basal, o choque e após 90 minutos de tratamento

	Basal				Choque				Tratamento			
	CTRL	NPS	NA	LEV	CTRL	NPS	NA	LEV	CTRL	NPS	NA	LEV
pH	7,40 ± 0,09	7,42 ± 0,05	7,36 ± 0,02	7,35 ± 0,04	7,32 ± 0,06	7,30 ± 0,14 *	7,27 ± 0,08 *	7,33 ± 0,88	7,43 ± 0,11 #	7,34 ± 0,08	7,34 ± 0,08	7,41 ± 0,09
HCO₃	33,85 ± 2,31	33,55 ± 4,01	32,40 ± 4,68	33,05 ± 5,35	27,15 ± 5,93 *	26,09 ± 6,05*	24,11 ± 5,49*	25,90 ± 6,32*	31,14 ± 3,45	27,25 ± 3,97*	26,21 ± 4,47 *	32,39 ± 4,34
BE	9,12 ± 2,90	9,25 ± 4,43	6,87 ± 4,76	9,75 ± 5,99	1,25 ± 6,56 *	0,00 ± 7,65 *	-2,25 ± 7,04 *	0,00 ± 5,78 *	7,12 ± 3,98	1,87 ± 4,76	0,62 ± 5,90	8,00 ± 4,66
pO₂	75,13 ± 20,65	78,13 ± 23,86	75,38 ± 22,92	79,00 ± 18,38	113,10 ± 24,47*	108,90 ± 23,59*	119,00 ± 29,64*	108,30 ± 29,14*	111,0 ± 21,45	107,4 ± 24,85	98,0 ± 28,75	102,30 ± 29,06
pCO₂	54,71 ± 12,29	51,33 ± 8,25	55,60 ± 7,90	61,20 ± 4,21	50,99 ± 8,04	51,19 ± 10,97	51,19 ± 6,58	49,39 ± 16,21	44,89 ± 11,91	49,04 ± 7,39	47,68 ± 4,91 *	51,55 ± 12,06
Lactato	1,45 ± 0,55	1,85 ± 1,11	1,31 ± 0,28	2,01 ± 1,71	5,87 ± 3,60*	5,01 ± 2,34*	5,25 ± 2,67*	6,59 ± 5,37*	2,68 ± 1,28	4,03 ± 1,97	3,09 ± 1,40	2,23 ± 0,82

Legenda: * p < 0,05 em relação ao momento basal; # p < 0,05 em relação ao momento do choque.

CTRL -grupo controle, NPS - grupo nitroprussiato, NA - grupo noradrenalina, LEV - grupo levosimendan

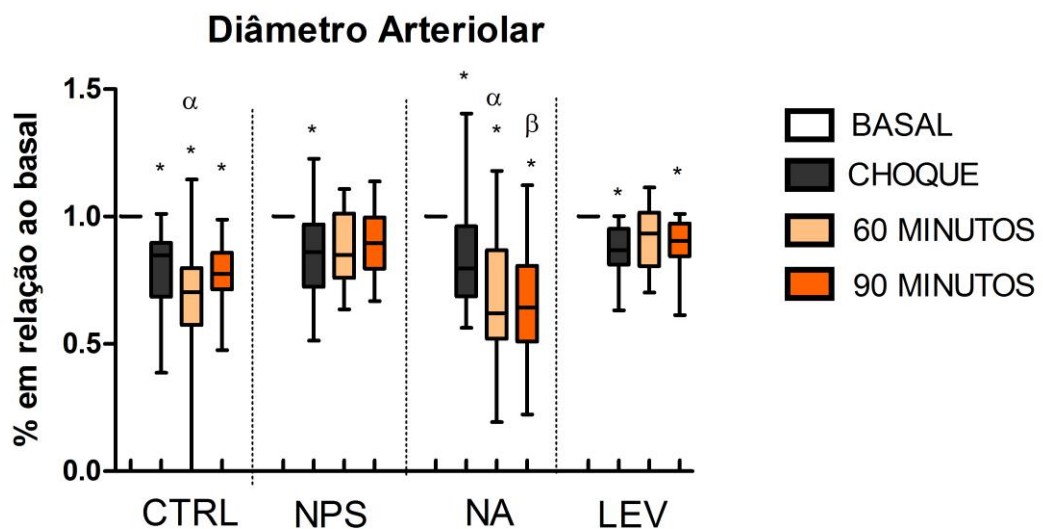
Fonte: O autor, 2014.

3.2 Diâmetro arteriolar

Após o período de choque, todos os grupos apresentaram uma queda significativa do diâmetro arteriolar em relação ao momento basal. O grupo CTRL não retornou aos valores basais após 60 ou 90 minutos de tratamento. O grupo NPS não apresentou diferença significativa em relação ao momento basal após o tratamento aos 60, assim como aos 90 minutos. Em relação ao grupo NA, este não conseguiu recuperar os valores basais em momento algum, mantendo diferença significativa aos 60 e 90 minutos em relação ao momento basal. O grupo LEV apresentou uma recuperação aos 60 minutos, não tendo diferença em relação ao momento basal, entretanto a melhora se perdeu aos 90 minutos

evidenciando a diferença significativa em relação ao momento basal. A análise intergrupos mostrou uma diferença significativa entre o NPS aos 60 minutos e o CTRL aos 60 minutos e entre o NPS aos 90 minutos e o NA aos 90 minutos.

Gráfico 3 - Evolução do diâmetro arteriolar ao longo do experimento. O gráfico mostra o momento basal como 100% (1.0). As outras barras mostram o percentual de variação em relação ao momento basal, nos momentos analisados dentro de cada grupo. As barras estão mostrando média e desvio padrão.



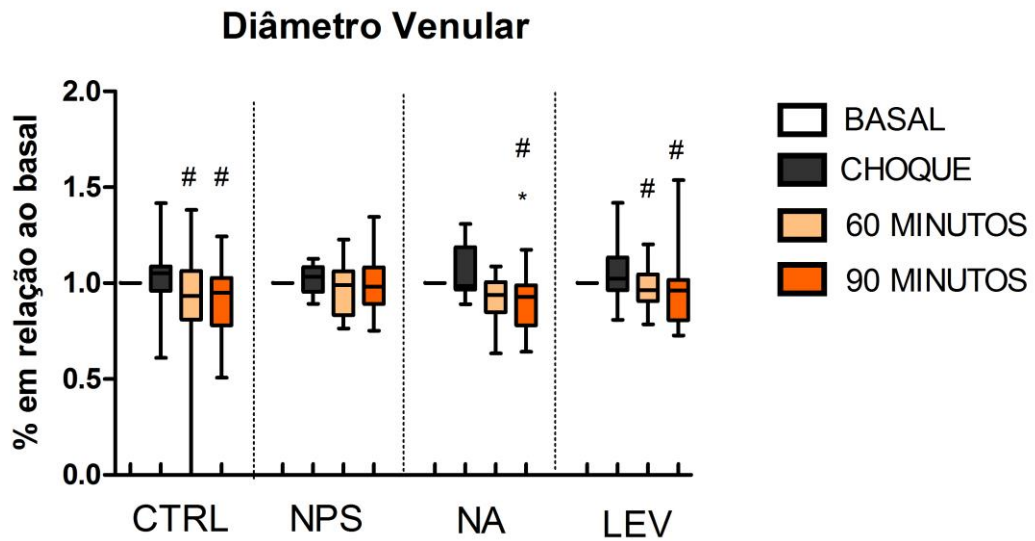
Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao momento basal. α $p < 0,05$ em relação ao momento NPS 60. β $p < 0,05$ em relação ao momento NPS 90. CTRL - grupo controle, NPS - grupo nitroprussiato, NA - grupo noradrenalina, LEV - grupo levosimendan

Fonte: O autor, 2014

3.3 Diâmetro venular

Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa após o choque em relação momento basal. O grupo CTRL apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao choque aos 60 e 90 minutos. O grupo NA também apresentou diferença não somente em relação choque, mas também em relação ao momento basal, apenas aos 90 minutos. O grupo LEV apresentou resultado similar ao grupo controle. Uma diferença significativa aos 60 e 90 minutos de tratamento em relação ao momento choque.

Gráfico 4 - Evolução do diâmetro venular ao longo do experimento.



O gráfico mostra o momento basal como 100% (1.0). As outras barras mostram o percentual de variação em relação ao momento basal, nos momentos analisados dentro de cada grupo. As barras estão mostrando média e desvio padrão.

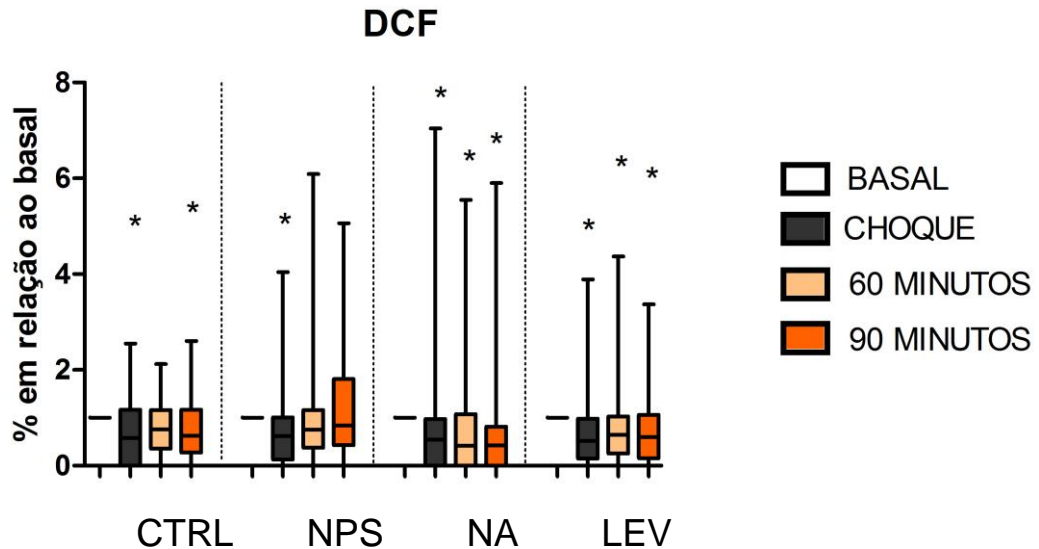
Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao momento basal. # $p < 0,05$ em relação ao momento choque.

CTRL - grupo controle, NPS - grupo nitroprussiato, NA - grupo noradrenalina, LEV - grupo levosimendan

3.4 Densidade Capilar Funcional

A densidade capilar funcional apresentou queda significativa em todos os grupos após o choque. No grupo CTRL, houve recuperação aos níveis basais após 60 minutos de tratamento, não sustentando a melhora após 90 minutos de tratamento. O grupo NPS apresentou um incremento na DCF, não havendo diferença estatística dos níveis basais após 60 e 90 minutos de tratamento. O grupo NA não recuperou os valores de DCF, apresentando diferença significativa dos valores basais aos 60 e 90 minutos de tratamento. O grupo LEV, de maneira similar apresentou uma diferença estatística em relação aos níveis basais aos 60 e 90 minutos, não retornando a valores próximos aos níveis basais em momento algum.

Gráfico 5 - Evolução da densidade capilar funcional (DCF) ao longo do experimento.



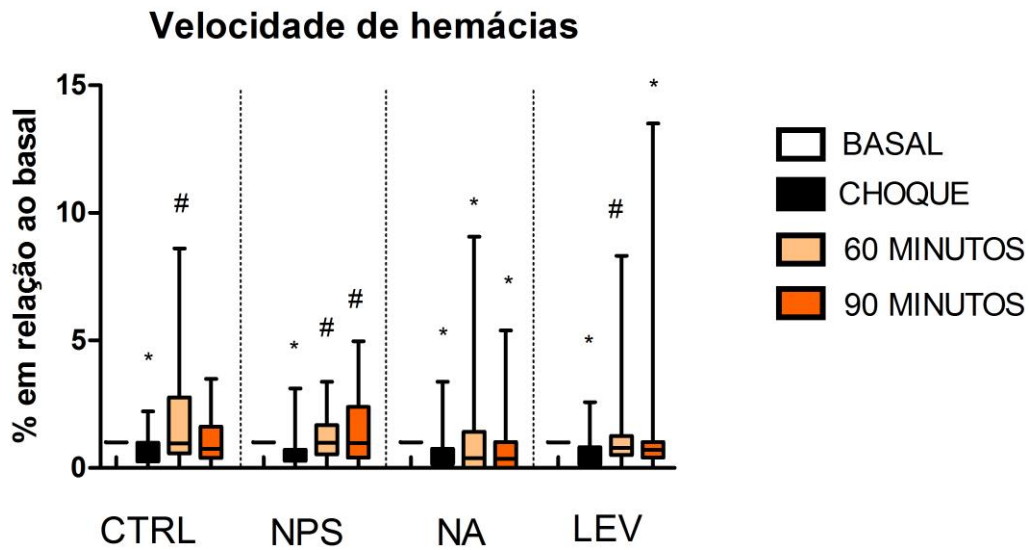
O gráfico mostra o momento basal como 100% (1.0). As outras barras mostram o percentual de variação em relação ao momento basal, nos momentos analisados dentro de cada grupo. As barras estão mostrando média e desvio padrão.

Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao momento basal. CTRL - grupo controle, NPS - grupo nitroprussiato, NA - grupo noradrenalina, LEV - grupo levosimendan

3.5 Velocidade de hemácias

Todos os grupos apresentaram uma queda significativa da velocidade capilar após o choque em relação ao momento basal. O grupo CTRL apresentou uma recuperação acentuada da velocidade capilar aos 60 minutos, apresentando inclusive, uma diferença significativa em relação ao momento do choque. Entretanto, aos 90 minutos de tratamento houve uma perda da velocidade, retornando aos níveis próximos do basal. O grupo NPS apresentou uma recuperação da velocidade, apresentando uma diferença significativa em relação ao choque aos 60 e 90 minutos. O grupo NA não recuperou a velocidade após o tratamento, mantendo a diferença em relação ao momento basal aos 60 e 90 minutos. O grupo LEV, assim como o grupo CTRL, recuperou a velocidade e apresentou uma diferença em relação ao momento choque, diminuindo a velocidade e perdendo essa diferença aos 90 minutos.

Gráfico 6 - Valores de velocidade de hemácias.



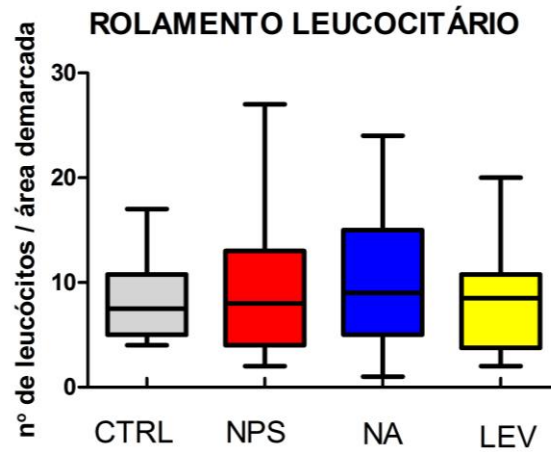
Nota: O gráfico mostra o momento basal como 100% (1.0). As outras barras mostram o percentual de variação em relação ao momento basal, nos momentos analisados dentro de cada grupo. As barras estão mostrando média e desvio padrão.

Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao momento basal. # $p < 0,05$ em relação ao momento do choque. CTRL - grupo controle, NPS - grupo nitroprussiato, NA - grupo noradrenalina, LEV - grupo levosimendan

3.6 Rolamento leucocitário

Na comparação entre os grupos, não houve diferença no número de leucócitos rolantes no endotélio.

Gráfico 7 - Número de leucócitos rolantes na superfície endotelial por área demarcada no vaso.

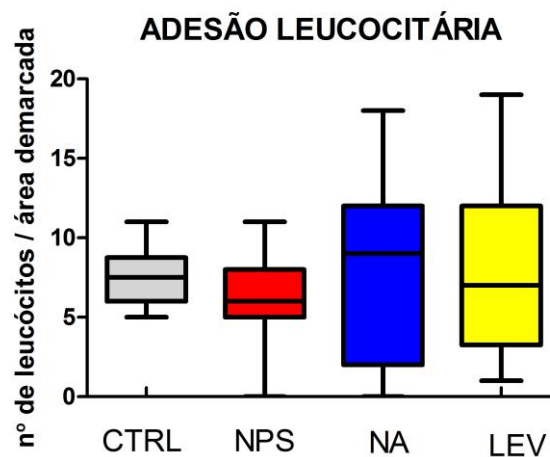


Fonte: O autor, 2014

3.7 Adesão leucocitária

Em relação à adesão, similarmente, não houve diferença significativa entre os grupos no número de leucócitos aderidos por área analisada.

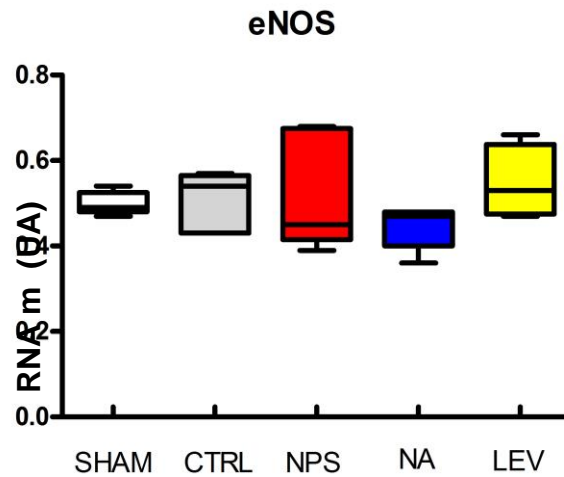
Gráfico 8 - Número de leucócitos aderidos na superfície endotelial por área demarcada no vaso.



3.8 Expressão gênica renal de eNOS

Não houve diferença na expressão gênica de eNOS entre os grupos no final do tratamento.

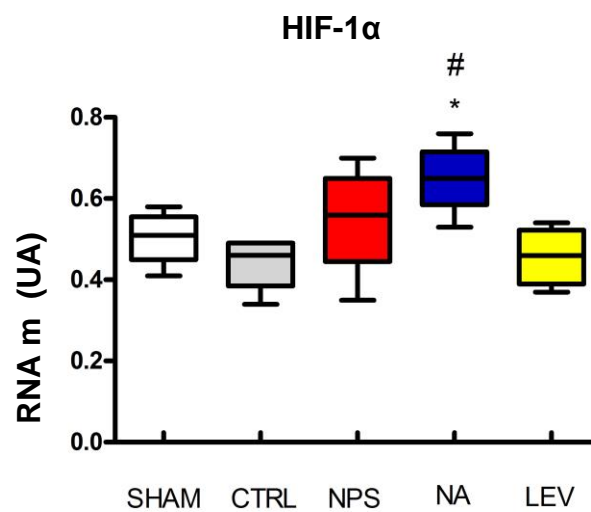
Gráfico 9 - Expressão gênica renal de eNOS em unidades arbitrárias (UA).



3.9 Expressão gênica renal de HIF-1 α

O grupo NA apresentou uma diferença significativa em relação ao grupo CTRL e ao grupo LEV. Não houveram outras diferenças significativas.

Gráfico 10 - Expressão gênica renal de HIF - 1 α em unidades arbitrárias (UA)

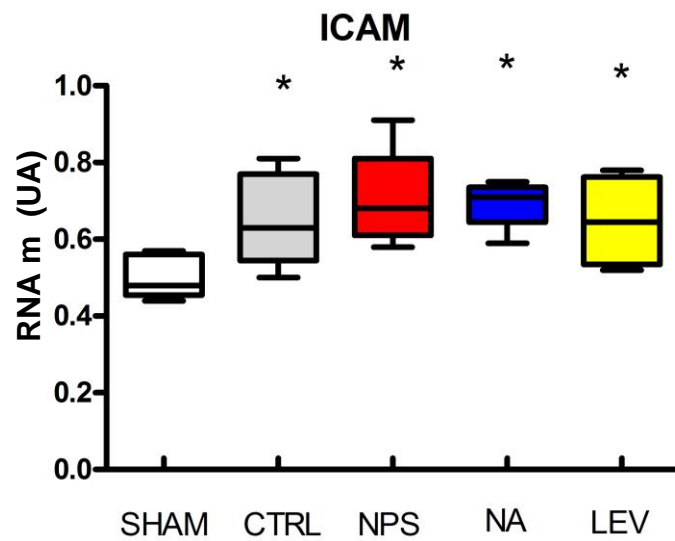


$p < 0,05$ em relação ao grupo LEV ; * $p < 0,05$ em relação ao grupo CTRL

3.10 Expressão gênica renal de ICAM

Todos os grupos apresentaram uma diferença significativa na expressão de ICAM em relação ao grupo SHAM.

Gráfico 11- Expressão gênica renal de ICAM em unidades arbitrárias (UA).

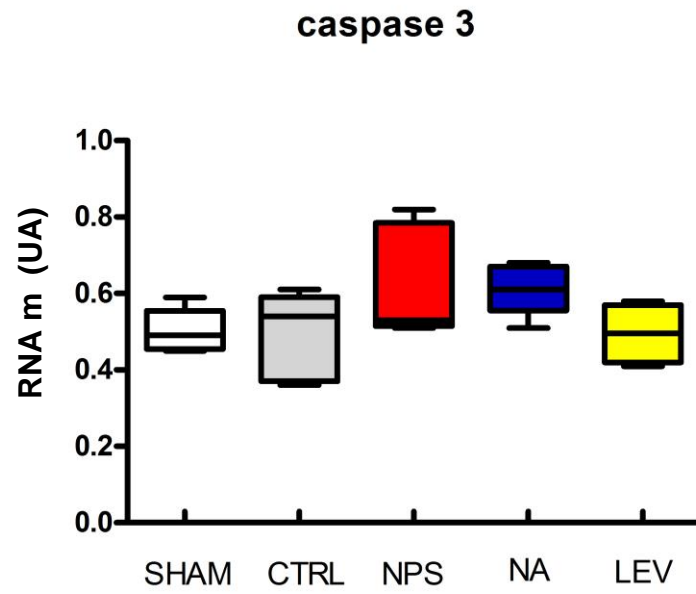


*p < 0,05 em relação ao grupo SHAM

3.11 Expressão gênica renal de caspase-3

Não houve diferença significativa em relação à atividade de caspase-3 em relação a nenhum dos grupos.

Gráfico 12 - Expressão gênica renal de caspase-3 em unidades arbitrárias (UA)



4 DISCUSSÃO

Uma dos sinais mais evidentes do choque hemorrágico é a hipotensão arterial sistêmica. Contudo, após a intensa resposta neuro-endócrina associada, restabelecer os níveis de pressão arterial aos níveis normais ou próximos, talvez não seja a melhor opção. Em nosso trabalho, os grupos CTRL e NA apresentaram médias mais altas de PAM e no entanto os parâmetros de perfusão microvascular não tiveram uma boa recuperação. Em consonância com esses achados, Tao Li e cols., (92) demonstraram em modelo de choque hemorrágico, que alvos mais baixos de pressão arterial se traduziram não somente em maior sobrevida, mas surpreendentemente também em melhores índices macrohemodinâmicos. Na realidade, vítimas de choque hemorrágico apresentam uma disfunção microvascular precoce. Estes apresentam índice menores de perfusão microvascular, apesar de seus parâmetros macrohemodinâmicos estarem normais (76).

Em relação ao hematócrito, durante o período de choque, houve uma queda em todos os grupos. Em uma perda hemorrágica do porte que realizamos, normalmente a pressão hidrostática do interstício se torna maior que a pressão intravascular e ocorre um movimento de líquido na direção dos vasos, ocorrendo uma hemodiluição progressiva. Esse processo continuou em todos os grupos, acentuando a hemodiluição após o final do tratamento e infusão de fluido. O grupo NA apresentou a menor queda após o tratamento, ficando discretamente mais hemoconcentrado. Isso evidencia uma contínua perda de líquido para fora do compartimento intravascular, o que pode contribuir para o agravamento do estado hipovolêmico. De fato, como discutido previamente, a infusão de noradrenalina após choque hemorrágico pode contrabalançar o efeito de absorção de líquidos para o intravascular, levando a uma progressiva perda de líquidos para o espaço intersticial. Dubniks e cols. já haviam demonstrado que a absorção de líquidos para o intravascular é contrabalançada pela noradrenalina. O aumento da pressão pós-capilar leva a contínua perda de líquido do vaso para o interstício (93).

A gasometria arterial, provê informações sobre a relação entre oferta de oxigênio e utilização deste, metabolismo tecidual, assim como respiração celular e ventilação. Alguns dos parâmetros listados são úteis como marcadores de perfusão tecidual global. Em nosso estudo, após o choque, houve uma diminuição global do pH, consumo de bases e aumento de lactato em todos os grupos. De uma maneira geral, isso reflete uma acidose metabólica consequente a passagem para o metabolismo anaeróbio devido a falta de oxigênio ofertado pela circulação. Após o tratamento, em todos os grupos houve uma melhora com recuperação

dos índices, porém exceções ocorreram. O consumo de bases, o qual continuou acontecendo, apresentou diferença com o momento basal nos grupos NPS e NA. A concentração persistentemente baixa de bicarbonato indica uma alta concentração de radicais ácidos. No caso do grupo NPS, a melhora da perfusão pode não ter ocorrido globalmente, privilegiando alguns leitos vasculares em detrimento de outros e favorecido o metabolismo anaeróbio e produção de lactato. Outro fator a ser considerado, é a produção de cianeto decorrente do metabolismo do nitroprussiato. Esse metabólito bloqueia a respiração celular, conduzindo ao metabolismo anaeróbio (94). Apesar de provavelmente não ser tão importante durante uma infusão por curto período, a associação com a resposta neuro-endócrina ao choque, pode ter colaborado para o resultado final. A menor pressão parcial de CO_2 no final do experimento reflete a hiperventilação, Essa tentativa fisiológica de eliminar CO_2 e baixar os níveis de ácidos não obteve um bom resultado no grupo NA, mantendo ainda um grande consumo de bicarbonato.

Ao nível microvascular, o choque hemorrágico se caracteriza pela acentuada constrição vascular periférica. Uma vez que se inicia a hipoperfusão de órgãos, uma marcada resposta neuro-hormonal é desencadeada, com secreção de catecolaminas, vasopressina e glicocorticóides (95). Esses estímulos hormonais promovem uma intensa vasoconstrição periférica, a despeito do estímulo vasodilatador local provocado pelo acúmulo de metabólitos e hipóxia tecidual. De fato, em todos os grupos, houve uma diminuição significativa do diâmetro arteriolar após 60 minutos de choque. Após o tratamento, o grupo CTRL e NA apresentaram uma manutenção da vasoconstrição, não recuperando diâmetros aos níveis basais. Sakai e colaboradores descreveram as alterações microvasculares durante o choque hemorrágico no modelo da câmara dorsal. Esse autor relatou uma vasoconstrição arterial significativa, especialmente em arteríolas de maior calibre (41). Em nosso estudo, foram mensuradas arteríolas de maior calibre, corroborando esses dados. Em relação às vênulas, não houveram alterações significativas após o choque, indo ao encontro das observações feitas no mesmo estudo de Sakai e cols. Estes reportaram constrição significativa apenas em veias de pequeno calibre mas não em vênulas. O grupo NPS apresentou uma recuperação dos diâmetros arteriulares após o tratamento. No lado venular, os diâmetros se mantiveram estáveis, não havendo diferenças entre o basal, choque ou ambos os momentos de tratamento. Suportando esses achados, em estudo realizado por Endrich e cols., a microcirculação foi avaliada na câmara dorsal após infusão de nitroprussiato sódico. Foi observada uma dilatação arteriolar significativa comparada com o momento basal. A infusão contínua da droga provocou um aumento no diâmetro de até 30% quando comparado com o momento basal. No

lado venular, a droga provocou uma dilatação de até 10%, consistente com a baixa variação encontrada em nosso estudo (96). Apesar desse estudo ter sido iniciado em condições fisiológicas, ao invés de durante choque hemorrágico, é importante por demonstrar o sítio anatômico microvascular de ação da droga. No grupo NA, similarmente ao grupo CTRL, houve uma vasoconstrição arteriolar e venular acentuadas. Durante os experimentos, a infusão pós-choque causou uma constrição progressiva no lado arteriolar. Mais ainda, houve uma similar constrição progressiva do lado venular. Friesenecker e cols. reportaram as ações da noradrenalina na microcirculação durante choque hemorrágico. Esse estudo demonstrou uma acentuada diminuição do diâmetro arteriolar globalmente, embora relativamente mais pronunciada em arteríolas de menor calibre (97). Ainda que, novamente, este seja um estudo iniciado em condições fisiológicas, por outro lado ressalta o intenso poder de constrição arteriolar desencadeado pela noradrenalina e corrobora nossos dados. É necessário ponderar que, no caso do choque hemorrágico, existe uma resposta neuroendócrina associada. Esse reflexo fisiopatológico libera na circulação e terminações simpáticas grandes quantidades de catecolaminas, colaborando para a intensa vasoconstrição observada nesse grupo.

Não há, até o momento, estudos no modelo da câmara dorsal observando efeitos microvasculares do levosimendan. É necessário ressaltar ainda que, segundo nosso conhecimento, inexistem estudos que o tenham utilizado durante o choque hemorrágico. Entretanto, há relatos experimentais e clínicos evidenciando melhoras clínicas pontuais no choque cardiogênico (98) e durante choque séptico (99). De acordo com as propriedades farmacológicas da droga, há uma base racional para utilizá-la durante o choque hipovolêmico, desde que o indivíduo esteja adequadamente ressuscitado em termos de volemia. Seu efeito inotrópico e vasodilatador proporciona, em teoria, um aumento do débito cardíaco e um maior aporte de sangue no leito microvascular. De fato, há estudos experimentais e clínicos observacionais demonstrando um melhora no fluxo microvascular em choque séptico (100, 101) mas não em choque cardiogênico ou outros tipos de choque. Em nosso estudo, o tratamento promoveu uma vasodilatação arteriolar que não se sustentou durante os 90 minutos de tratamento.

De acordo com a teoria do "esfíncter passivo", uma maior dilatação arteriolar promoveria um maior aporte sanguíneo nas arteríolas terminais, transmitindo melhor a pressão sanguínea do lado arterial para os capilares que dela se originam. Cabrales e cols. demonstraram que o aumento da pressão nos capilares tem uma correlação direta com um aumento da densidade capilar funcional (65). Este é sem dúvida, o parâmetro mais

importante da microhemodinâmica. É através desse dado que efetivamente podemos verificar se o tecido está sendo adequadamente perfundido e o sistema cardiovascular está cumprindo seu papel. Além do aumento efetivo do número de capilares perfundidos, outro dado hemodinâmico extraído dos capilares é a velocidade de hemácias em seu interior. Uma vez que a velocidade em determinada região é igual ao fluxo sobre área, uma menor velocidade das hemácias implica que o fluxo está igual e a área perfundida aumentou ou o fluxo diminuiu globalmente e a área perfundida permaneceu igual. O oposto é válido para um aumento de velocidade em determinada região.

Kerger e cols. demonstraram que a diminuição da densidade capilar funcional tem forte correlação com a sobrevivência (102). A acumulação de metabólitos tóxicos nos tecidos provavelmente tem um papel importante, uma vez que a diminuição da DCF acompanha um aumento do pH tecidual (103). Em nosso estudo, houve uma diminuição significativa da densidade capilar funcional em todos os grupos após o choque hemorrágico. Além disso, a velocidade de hemácias caiu significativamente em todos os grupos após os 60 minutos de hemorragia. No grupo CTRL, após o tratamento, houve uma recuperação da DCF aos níveis basais em 60 minutos que não se sustentou aos 90 minutos. Em relação à velocidade de hemácias, houve um grande aumento após o tratamento em 60 minutos, recuperando significativamente até mesmo acima do momento do choque. Essa acentuada melhora não se mostrou sustentável em 90 minutos, ocorrendo uma queda na velocidade. No estudo realizado por Villela e cols. (104), a infusão com RL puro também falhou em manter a DCF. Após 90 minutos de tratamento, os valores encontravam-se abaixo dos níveis basais, assim como em nosso estudo. Os dados da DCF e velocidade combinados sugerem que a infusão da solução cristalóide de RL consegue recuperar a DCF durante algum tempo mas essa melhora não é sustentável. Primeiramente ocorre uma recuperação parcial da DCF e do fluxo microvascular na área e em torno de 90 minutos, essas melhoras começam a se evanescer.

No grupo NPS, além da restauração significativa da DCF, a recuperação da velocidade é marcadamente mais paulatina. Isso pode indicar uma tendência a um restabelecimento progressivo da área de perfusão, aumentando esta lentamente. O uso de doadores de óxido nítrico não é uma idéia nova. Existem estudos relatando recrutamento de capilares com doadores de óxido nítrico durante insuficiência cardíaca e sepse (86, 105). A partir disso, existe uma base racional para utilizá-los em uma situação de vasoconstrição acentuada e abrir os leitos microvasculares. De fato, trabalhos relativamente recentes demonstram que ofertar óxido nítrico pode recuperar o fluxo microvascular no trato gastrointestinal após o choque

hemorrágico, apesar de uma queda significativa na pressão arterial média (106). Mais ainda, já foi reportado que partículas liberadoras de óxido nítrico podem recuperar a DCF após choque hemorrágico. Por liberar o óxido nítrico em microvasos ao invés de vasos maiores, em teoria, essas moléculas poderiam promover uma vasodilatação mais seletiva na microcirculação, mantendo assim os parâmetros macrohemodinâmicos mais estáveis (107). Corroborando a importância do óxido nítrico para a manutenção do fluxo microvascular, já foi reportado que a reposição volêmica com soluções baseadas em hemoglobina podem causar perda de densidade capilar funcional (108). Evidências indicam que essa piora deve-se a um efeito sequestrador de óxido nítrico, causando vasoconstrição e fechamento de capilares (109). De maneira similar, sangue estocado durante muito tempo pode liberar partículas de hemoglobina, que da mesma maneira, levam ao sequestro de ON (110).

No grupo NA, houve uma manutenção da baixa DCF proporcionada associada a baixa velocidade de hemácias. Durante muitos anos e até o presente momento, a utilização de vasopressores tem sido uma pedra angular no tratamento do paciente hipotenso refratário à reposição volêmica. Apesar de haver evidências experimentais de melhora de sobrevivência (111), estas são a curto prazo. Semir e cols. revelaram que o uso de noradrenalina pode melhorar variáveis macrohemodinâmicas como débito cardíaco e variação de pressão de pulso. Por outro lado, isso pode ocorrer a custo de uma redistribuição de fluxo de pequenos para grandes vasos, mascarando um provável déficit de líquidos (112). Mais ainda, a perda de líquidos para o interstício pode ter agravado a perfusão microvascular. A importante constrição arterial diminuindo o fluxo aos capilares, associado a uma constrição venosa acentuada aumenta o extravasamento para o interstício. Isso pode ter conduzido a um ciclo vicioso de hipovolemia e vasoconstrição, piorando cada vez mais a DCF e o fluxo, refletido pela velocidade de hemácias. Previamente, um estudo publicado por nosso grupo já apontava essa tendência. Comparando o uso de noradrenalina com vasopressina durante o choque hemorrágico, observamos a mesma intensa vasoconstrição arteriolar e queda da DCF com o uso de noradrenalina. A vasopressina demonstrou melhores resultados, entretanto uma vez bloqueados os receptores V2, mais relacionados à vasodilatação, a melhora no fluxo microvascular evanesceu (113).

Em relação à terapia com levosimendan não houve melhora significativa na DCF. Revendo a literatura médica, existem evidências de melhora em parâmetros macrohemodinâmicos, porém poucos indícios de melhora do fluxo microvascular. Na realidade, existe um baixo número de estudos medindo parâmetros microvasculares em

vigência de levosimendan. Um estudo recente com laser - doppler favorece o uso da droga após isquemia-reperusão (114). Os estudos sobre levosimendan citados previamente no texto encontram-se em contexto absolutamente diferente, nenhum desses tratando sobre choque hemorrágico, entretanto denotam uma certa capacidade da droga em modificar parâmetros microvasculares. Em nosso estudo, a melhora na DCF não foi significativa e o aumento da velocidade de hemácias após o tratamento não se sustentou. No caso do choque hemorrágico, talvez a acentuada resposta neuroendócrina possa ter se sobreposto dilatação arteriolar distal e melhora do fluxo microvascular. Outro fato a ser considerado, é o uso da microscopia intravital, a qual é mais sensível para detectar fluxo capilar comparado com o laser doppler. Além disso, a eventual melhora, se alguma, pode ocorrer em leitos vasculares específicos, não sendo efetiva nos microvasos da câmara dorsal.

No contexto do choque hemorrágico, um fator com impacto direto no fluxo microvascular é a resposta inflamatória. Em estados de baixa perfusão, lesões teciduais com morte celular conduzem a uma resposta inflamatória para remoção dos debris celulares. A perda da integridade celular leva a liberação de certas sequências moleculares conhecidas como DAMPs (danger associated molecular patterns). Diversos fragmentos moleculares são reconhecidos por receptores multiligantes como RAGE (receptor for advanced glycation end products) e TLRs (toll like receptor). Essas ligações estimulam a produção de diversas citocinas e quimiocinas, atraindo células inflamatórias como neutrófilos e monócitos para limpar os restos celulares (115).

Uma etapa para o recrutamento dessas células, é feita através do endotélio ativado. Moléculas de superfície como selectinas e moléculas de adesão fream o leucócito circulante e o aderem para que ele posteriormente transmigre para o tecido (116). Como medida indireta da atividade inflamatória, utilizamos a contagem de leucócitos rolantes e aderidos no endotélio. Em nosso estudo não evidenciamos diferenças significativas nos números de leucócitos aderentes ou rolantes. Em estudo realizado por Xu e cols., há um relato de aumento de PCAM após três a 24 h de choque hemorrágico (117), evidenciando que efetivamente ocorre ativação endotelial.

Durante o choque hemorrágico, o organismo como um todo é submetido à hipoperfusão, entretanto alguns órgãos são mais suscetíveis à lesões. Dentre esses, podemos destacar o rim. Insuficiência renal aguda é um desfecho frequente desencadeado por depleção de volume e responsável por grande morbi-mortalidade hospitalar (118). Um fator crucial para o desenvolvimento dessas lesões é a resposta inflamatória. Há um extenso número de

moléculas envolvidas no processo, desde fatores de transcrição até proteínas de superfície endotelial.

Dentre os fatores de transcrição, analisamos a expressão de HIF 1- α . Essa molécula começa a ser produzida quase que imediatamente quando a célula é exposta à baixa concentração de oxigênio, se acumula com a continuidade do insulto, induzindo a expressão de diversos genes relacionados à hipoxemia (119). Em nosso estudo percebemos um aumento significativo de HIF-1 α no grupo NA comparado com o grupo controle e o grupo LEV. Esse achado está em acordo com a menor DCF e conseqüentemente menor oxigenação tecidual no grupo NA. Um dos genes estimulados pelo HIF -1 α é o da molécula de eNOS. Essa é uma enzima constitutiva e sua produção encontra-se intimamente ligada ao estresse de cisalhamento do sangue, estimulando mecanorreceptores endoteliais (120). Apesar de encontrar-se aumentada no choque hemorrágico (121), a expressão gênica de eNOS não apontou diferenças significativas entre os grupos. Não podemos excluir que um maior período de tratamento ressaltaria diferenças, uma vez que a concentração do principal fator transcricional envolvido (HIF 1- α) já encontra-se diferenciada. Além disso, há diferentes fluxos microvasculares nos grupos e conseqüentemente diferentes estresses de cisalhamento sobre o endotélio.

O choque hemorrágico desencadeia uma liberação precoce de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α (122). O próximo passo no recrutamento de células inflamatórias é transcrição de RNA para produção de moléculas de superfície. Em nosso estudo detectamos um aumento significativo na expressão gênica de ICAM renal em todos os grupos em relação ao grupo SHAM. O período de choque evidentemente aumentou essa expressão, porém, nenhum tratamento em particular minimizou ou mesmo aumentou a transcrição de ICAM. Esses dados estão em concordância com os dados de rolamento e adesão leucocitários, uma vez que não encontramos diferenças na câmara após 90 minutos de tratamento.

A morte celular e a liberação de moléculas intracelulares são fatores alimentadores da resposta inflamatória como discutido anteriormente. Nessa vertente, analisamos a expressão gênica de caspase-3. As caspases iniciadoras são enzimas que uma vez clivadas e ativas, iniciam a clivagem de outras caspases, as quais efetivamente clivam enzimas e moléculas (caspases efetoras), iniciando o processo de morte celular. A caspase-3 é uma caspase efetora e embora a maior regulação de sua atividade seja por conta da clivagem *per se* e conseqüente ativação, um aumento da regulação da expressão gênica dessas enzimas ocorre rapidamente na presença de estímulo nocivo (123). É fato que moléculas exógenas podem influenciar o

processo de apoptose. Existem relatos descrevendo que a noradrenalina pode aumentar a atividade (124), assim como ON (125) e levosimendan (126) podem inibir a atividade da caspase 3. Em relação à expressão gênica entretanto, não detectamos diferenças significativas após os 90 minutos de tratamento. Esse fato pode denotar pouco tempo de terapia ou a incapacidade dessas drogas em reverter a tendência iniciada durante o choque.

É necessário ressaltar que esse estudo tem limitações importantes. Trata-se um modelo experimental em condições controladas. Apesar dos níveis pressóricos encontrarem-se baixos, não ultrapassam o valor controlado de 40 mm Hg. Mais ainda, esse é um protocolo de choque hemorrágico não associado a trauma. Fato pouco comum na prática clínica.

CONCLUSÕES

Dentre as drogas utilizadas em conjunto com a reposição volêmica, a característica vasodilatadora do nitroprussiato foi a que provocou maior dilatação arteriolar e mostrou-se mais capaz de recrutar capilares na fase aguda do choque hemorrágico. Durante o período analisado, não houveram grandes diferenças na resposta inflamatória, seja na câmara dorsal ou no tecido renal. Em relação ao rim, houve uma maior expressão de HIF 1- α no grupo NA, denotando uma maior resposta hipóxica desencadeada pela noradrenalina. Se por um lado nosso trabalho não conseguiu demonstrar de maneira irrefutável uma melhora na perfusão global por algum agente, por outro é indiscutível que dois agentes tiveram resultados marcantes. O nitroprussiato causou uma melhora no fluxo e no número de capilares pérvios, enquanto a noradrenalina provocou uma piora do fluxo microvascular globalmente.

Essas características podem ser decisivas na fase aguda do choque, promovendo o recrutamento progressivo de capilares e melhora da hipoperfusão em determinados leitos capilares, assim como o contrário, com agravamento da disfunção tecidual, inflamação e progressiva falência orgânica. Propiciar a abertura de leitos microvasculares durante a fase aguda do choque hemorrágico pode manter a viabilidade tecidual. Outros estudos serão necessários para determinar se, em maiores períodos de tempo, infusões com vasodilatadores podem diminuir a cascata inflamatória que conduz à disfunção orgânica.

REFERÊNCIAS

1. Chandran A, Sousa TR, Guo Y, Bishai D, Pechansky F, Vida No Transito Evaluation T. Road traffic deaths in Brazil: rising trends in pedestrian and motorcycle occupant deaths. *Traffic injury prevention*. 2012;13 Suppl 1:11-6.
2. Krug EG, Sharma GK, Lozano R. The global burden of injuries. *Am J Public Health*. 2000;90(4):523-6.
3. Soreide K, Kruger AJ, Vardal AL, Ellingsen CL, Soreide E, Lossius HM. Epidemiology and contemporary patterns of trauma deaths: changing place, similar pace, older face. *World journal of surgery*. 2007;31(11):2092-103.
4. Baker CC, Oppenheimer L, Stephens B, Lewis FR, Trunkey DD. Epidemiology of trauma deaths. *Am J Surg*. 1980;140(1):144-50.
5. Bellamy RF. The causes of death in conventional land warfare: implications for combat casualty care research. *Military medicine*. 1984;149(2):55-62.
6. Wright CS, McMurtry RY, Hoyle M, Pickard J. Preventable deaths in multiple trauma: review of deaths at Sunnybrook Medical Centre Trauma Unit. *Can J Surg*. 1983;26(1):20-3.
7. Minei JP, Cuschieri J, Sperry J, Moore EE, West MA, Harbrecht BG, et al. The changing pattern and implications of multiple organ failure after blunt injury with hemorrhagic shock. *Critical care medicine*. 2012;40(4):1129-35.
8. Berne RM, Koeppen BM, Stanton BA. *Berne & Levy physiology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier; 2010. xii, 836 p. p.
9. Bongard FS, Sue DY. *current critical care diagnosis and treatment*. 2nd edition ed. New York: Mc Graw-Hill; 2003 3/15/2008. 945 p.
10. Kreimeier U. Pathophysiology of fluid imbalance. *Critical care*. 2000;4 Suppl 2:S3-7.
11. Doherty GM, Way LW. *Current surgical diagnosis & treatment*. 12th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2006. xviii, 1453 p. p.
12. Bongard FS, Sue DY, Vintch JRE. *Current diagnosis & treatment : critical care*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2008. xi, 878 p. p.
13. Gann DS, Drucker WR. Hemorrhagic shock. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2013;75(5):888-95.
14. Krogh A. The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation. *The Journal of physiology*. 1919;52(6):457-74.
15. Junqueira LCU, Carneiro J, Contopoulos AN. *Basic histology. A Concise medical library for practitioner and student*. Los Altos, Calif.: McGraw-Hill Publishing Co 1998. p. 494 pages.

16. West WT. Histologic study of living striated muscle fibers in situ in the cheek pouch of the golden hamster. *Am J Anat.* 1958;103(3):349-73.
17. Witte S. [Methodical possibilities for the study of vascular permeability using intravital fluorescence microscopy]. *Klinische Wochenschrift.* 1967;45(19):961-5.
18. Kozlov VI. [Technic of intravital study of microcirculation in m. cremaster in transmitted light]. *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny.* 1971;71(5):121-3.
19. Fulton GP, Jackson RG, Lutz BR. Cinephotomicroscopy of Normal Blood Circulation in the Cheek Pouch of the Hamster. *Science.* 1947;105(2727):361-2.
20. Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Research in experimental medicine Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie.* 1980;177(2):125-34.
21. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science.* 2010;330(6002):362-6.
22. Dunn KW, Sandoval RM, Molitoris BA. Intravital imaging of the kidney using multiparameter multiphoton microscopy. *Nephron Experimental nephrology.* 2003;94(1):e7-11.
23. Looney MR, Thornton EE, Sen D, Lamm WJ, Glenn RW, Krummel MF. Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nature methods.* 2011;8(1):91-6.
24. Pai S, Danne KJ, Qin J, Cavanagh LL, Smith A, Hickey MJ, et al. Visualizing leukocyte trafficking in the living brain with 2-photon intravital microscopy. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2012;6:67.
25. Smith V, Pizzorni C, De Keyser F, Decuman S, Van Praet JT, Deschepper E, et al. Reliability of the qualitative and semiquantitative nailfold videocapillaroscopy assessment in a systemic sclerosis cohort: a two-centre study. *Annals of the rheumatic diseases.* 2010;69(6):1092-6.
26. De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, Goedhart P, Buchele G, Ospina-Tascon G, et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Critical care.* 2007;11(5):R101.
27. Bezemer R, Dobbe JG, Bartels SA, Boerma EC, Elbers PW, Heger M, et al. Rapid automatic assessment of microvascular density in sidestream dark field images. *Medical & biological engineering & computing.* 2011;49(11):1269-78.
28. Powers EW, 3rd, Frayer WW. Laser Doppler measurement of blood flow in the microcirculation. *Plast Reconstr Surg.* 1978;61(2):250-5.

29. Dubin A, Pozo MO, Casabella CA, Palizas F, Jr., Murias G, Moseinco MC, et al. Increasing arterial blood pressure with norepinephrine does not improve microcirculatory blood flow: a prospective study. *Critical care*. 2009;13(3):R92.
30. Honig CR, Odoroff CL, Frierson JL. Capillary recruitment in exercise: rate, extent, uniformity, and relation to blood flow. *The American journal of physiology*. 1980;238(1):H31-42.
31. Honig CR, Odoroff CL, Frierson JL. Active and passive capillary control in red muscle at rest and in exercise. *The American journal of physiology*. 1982;243(2):H196-206.
32. Kaley G, Rodenburg JM, Messina EJ, Wolin MS. Endothelium-associated vasodilators in rat skeletal muscle microcirculation. *The American journal of physiology*. 1989;256(3 Pt 2):H720-5.
33. Klitzman B, Damon DN, Gorczynski RJ, Duling BR. Augmented tissue oxygen supply during striated muscle contraction in the hamster. Relative contributions of capillary recruitment, functional dilation, and reduced tissue PO₂. *Circulation research*. 1982;51(6):711-21.
34. Goodman AH, Einstein R, Granger HJ. Effect of changing metabolic rate on local blood flow control in the canine hindlimb. *Circulation research*. 1978;43(5):769-76.
35. Gilmore JP, Cornish KG, Rogers SD, Joyner WL. Direct evidence for myogenic autoregulation of the renal microcirculation in the hamster. *Circulation research*. 1980;47(2):226-30.
36. Batchinsky AI, Cooke WH, Kuusela TA, Jordan BS, Wang JJ, Cancio LC. Sympathetic nerve activity and heart rate variability during severe hemorrhagic shock in sheep. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*. 2007;136(1-2):43-51.
37. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *Journal of immunology*. 2007;178(10):6017-22.
38. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
39. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-6.
40. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*. 1989;38(11):1709-15.
41. Sakai H, Hara H, Tsai AG, Tsuchida E, Johnson PC, Intaglietta M. Changes in resistance vessels during hemorrhagic shock and resuscitation in conscious hamster model. *The American journal of physiology*. 1999;276(2 Pt 2):H563-71.

42. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, et al. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med*. 1998;187(6):917-28.
43. Kan W, Zhao KS, Jiang Y, Yan W, Huang Q, Wang J, et al. Lung, spleen, and kidney are the major places for inducible nitric oxide synthase expression in endotoxic shock: role of p38 mitogen-activated protein kinase in signal transduction of inducible nitric oxide synthase expression. *Shock*. 2004;21(3):281-7.
44. Thiemermann C, Szabo C, Mitchell JA, Vane JR. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(1):267-71.
45. Rhee SG. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006;312(5782):1882-3.
46. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*. 1995;268(5 Pt 1):L699-722.
47. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 1991;266(7):4244-50.
48. Zhao KS, Liu J, Yang GY, Jin C, Huang Q, Huang X. Peroxynitrite leads to arteriolar smooth muscle cell membrane hyperpolarization and low vasoreactivity in severe shock. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2000;23(2-4):259-67.
49. Lee CC, Chang IJ, Yen ZS, Hsu CY, Chen SY, Su CP, et al. Delayed fluid resuscitation in hemorrhagic shock induces proinflammatory cytokine response. *Annals of emergency medicine*. 2007;49(1):37-44.
50. Shires GT, Browder LK, Steljes TP, Williams SJ, Browder TD, Barber AE. The effect of shock resuscitation fluids on apoptosis. *American journal of surgery*. 2005;189(1):85-91.
51. Rotondo MF, Schwab CW, McGonigal MD, Phillips GR, 3rd, Fruchterman TM, Kauder DR, et al. 'Damage control': an approach for improved survival in exsanguinating penetrating abdominal injury. *The Journal of trauma*. 1993;35(3):375-82; discussion 82-3.
52. Smith IM, Beech ZK, Lundy JB, Bowley DM. A Prospective Observational Study of Abdominal Injury Management in Contemporary Military Operations: Damage Control Laparotomy Is Associated With High Survivability and Low Rates of Fecal Diversion. *Annals of surgery*. 2014.
53. Lieberman JA, Weiskopf RB, Kelley SD, Feiner J, Noorani M, Leung J, et al. Critical oxygen delivery in conscious humans is less than 7.3 ml O₂ x kg(-1) x min(-1). *Anesthesiology*. 2000;92(2):407-13.

54. Vincent JL, Baron JF, Reinhart K, Gattinoni L, Thijs L, Webb A, et al. Anemia and blood transfusion in critically ill patients. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002;288(12):1499-507.
55. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, et al. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999;282(19):1857-64.
56. Saxena R, Wijnhoud AD, Carton H, Hacke W, Kaste M, Przybelski RJ, et al. Controlled safety study of a hemoglobin-based oxygen carrier, DCLHb, in acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1999;30(5):993-6.
57. Wettstein R, Erni D, Intaglietta M, Tsai AG. Rapid restoration of microcirculatory blood flow with hyperviscous and hyperoncotic solutions lowers the transfusion trigger in resuscitation from hemorrhagic shock. *Shock*. 2006;25(6):641-6.
58. Haas T, Fries D, Holz C, Innerhofer P, Streif W, Klingler A, et al. Less impairment of hemostasis and reduced blood loss in pigs after resuscitation from hemorrhagic shock using the small-volume concept with hypertonic saline/hydroxyethyl starch as compared to administration of 4% gelatin or 6% hydroxyethyl starch solution. *Anesthesia and analgesia*. 2008;106(4):1078-86, table of contents.
59. Vincenzi R, Cepeda LA, Pirani WM, Sannomyia P, Rocha ESM, Cruz RJ, Jr. Small volume resuscitation with 3% hypertonic saline solution decrease inflammatory response and attenuates end organ damage after controlled hemorrhagic shock. *American journal of surgery*. 2009;198(3):407-14.
60. Krausz MM, Bashenko Y, Hirsh M. Crystalloid and colloid resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock following massive splenic injury. *Shock*. 2001;16(5):383-8.
61. Wang P, Li Y, Li J. Hydroxyethyl starch 130/0.4 prevents the early pulmonary inflammatory response and oxidative stress after hemorrhagic shock and resuscitation in rats. *International immunopharmacology*. 2009;9(3):347-53.
62. Balkamou X, Xanthos T, Stroumpoulis K, Moutzouris DA, Rokas G, Agrogiannis G, et al. Hydroxyethyl starch 6% (130/0.4) ameliorates acute lung injury in swine hemorrhagic shock. *Anesthesiology*. 2010;113(5):1092-8.
63. Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M. Hyperosmotic-hyperoncotic versus hyperosmotic-hyperviscous: small volume resuscitation in hemorrhagic shock. *Shock*. 2004;22(5):431-7.
64. Cabrales P, Martini J, Intaglietta M, Tsai AG. Blood viscosity maintains microvascular conditions during normovolemic anemia independent of blood oxygen-carrying capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H581-90.
65. Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M. Microvascular pressure and functional capillary density in extreme hemodilution with low- and high-viscosity dextran and a low-

- viscosity Hb-based O₂ carrier. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004;287(1):H363-73.
66. Paes-da-Silva F, Gonzalez AP, Tibirica E. Effects of fluid resuscitation on mesenteric microvascular blood flow and lymphatic activity after severe hemorrhagic shock in rats. *Shock*. 2003;19(1):55-60.
 67. de Jonge E, Levi M. Effects of different plasma substitutes on blood coagulation: a comparative review. *Critical care medicine*. 2001;29(6):1261-7.
 68. Laxenaire MC, Charpentier C, Feldman L. [Anaphylactoid reactions to colloid plasma substitutes: incidence, risk factors, mechanisms. A French multicenter prospective study]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. 1994;13(3):301-10.
 69. Myburgh JA, Finfer S, Bellomo R, Billot L, Cass A, Gattas D, et al. Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care. *The New England journal of medicine*. 2012;367(20):1901-11.
 70. Cotton BA, Guy JS, Morris JA, Jr., Abumrad NN. The cellular, metabolic, and systemic consequences of aggressive fluid resuscitation strategies. *Shock*. 2006;26(2):115-21.
 71. Choi PT, Yip G, Quinonez LG, Cook DJ. Crystalloids vs. colloids in fluid resuscitation: a systematic review. *Critical care medicine*. 1999;27(1):200-10.
 72. Perel P, Roberts I. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;6:CD000567.
 73. Morrison CA, Carrick MM, Norman MA, Scott BG, Welsh FJ, Tsai P, et al. Hypotensive resuscitation strategy reduces transfusion requirements and severe postoperative coagulopathy in trauma patients with hemorrhagic shock: preliminary results of a randomized controlled trial. *The Journal of trauma*. 2011;70(3):652-63.
 74. Capone AC, Safar P, Stezoski W, Tisherman S, Peitzman AB. Improved outcome with fluid restriction in treatment of uncontrolled hemorrhagic shock. *Journal of the American College of Surgeons*. 1995;180(1):49-56.
 75. Kim SH, Stezoski SW, Safar P, Capone A, Tisherman S. Hypothermia and minimal fluid resuscitation increase survival after uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *The Journal of trauma*. 1997;42(2):213-22.
 76. Tachon G, Harrois A, Tanaka S, Kato H, Huet O, Pottecher J, et al. Microcirculatory Alterations in Traumatic Hemorrhagic Shock. *Critical care medicine*. 2014.
 77. Rognoni A, Lupi A, Lazzero M, Bongo AS, Rognoni G. Levosimendan: from basic science to clinical trials. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. 6(1):9-15.
 78. De Witt BJ, Ibrahim IN, Bayer E, Fields AM, Richards TA, Banister RE, et al. An analysis of responses to levosimendan in the pulmonary vascular bed of the cat. *Anesth Analg*. 2002;94(6):1427-33, table of contents.

79. Follath F, Cleland JG, Just H, Papp JG, Scholz H, Peuhkurinen K, et al. Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. *Lancet*. 2002;360(9328):196-202.
80. Bergh CH, Andersson B, Dahlstrom U, Forfang K, Kivikko M, Sarapohja T, et al. Intravenous levosimendan vs. dobutamine in acute decompensated heart failure patients on beta-blockers. *Eur J Heart Fail*.12(4):404-10.
81. Sareila O, Korhonen R, Auvinen H, Hamalainen M, Kankaanranta H, Nissinen E, et al. Effects of levo- and dextrosimendan on NF-kappaB-mediated transcription, iNOS expression and NO production in response to inflammatory stimuli. *Br J Pharmacol*. 2008;155(6):884-95.
82. Kyrzopoulos S, Adamopoulos S, Parissis JT, Rassias J, Kostakis G, Iliodromitis E, et al. Levosimendan reduces plasma B-type natriuretic peptide and interleukin 6, and improves central hemodynamics in severe heart failure patients. *International journal of cardiology*. 2005;99(3):409-13.
83. Morelli A, Donati A, Ertmer C, Rehberg S, Lange M, Orecchioni A, et al. Levosimendan for resuscitating the microcirculation in patients with septic shock: a randomized controlled study. *Crit Care*.14(6):R232.
84. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90(1):278-81.
85. Roberts BW, Mitchell J, Kilgannon JH, Chansky ME, Trzeciak S. Nitric oxide donor agents for the treatment of ischemia/reperfusion injury in human subjects: a systematic review. *Shock*. 2013;39(3):229-39.
86. den Uil CA, Lagrand WK, Spronk PE, van der Ent M, Jewbali LS, Brugts JJ, et al. Low-dose nitroglycerin improves microcirculation in hospitalized patients with acute heart failure. *European journal of heart failure*. 2009;11(4):386-90.
87. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 10th ed. Philadelphia: Saunders; 2000. xxxii, 1064 p. p.
88. Bourdarias JP, Dubourg O, Gueret P, Ferrier A, Bardet J. Inotropic agents in the treatment of cardiogenic shock. *Pharmacol Ther*. 1983;22(1):53-79.
89. Barash PG. *Clinical anesthesia*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p. p.
90. Desjars P, Pinaud M, Bugnon D, Tasseau F. Norepinephrine therapy has no deleterious renal effects in human septic shock. *Crit Care Med*. 1989;17(5):426-9.
91. Meybohm P, Renner J, Boening A, Cavus E, Grasner JT, Grunewald M, et al. Impact of norepinephrine and fluid on cerebral oxygenation in experimental hemorrhagic shock. *Pediatr Res*. 2007;62(4):440-4.

92. Li T, Zhu Y, Fang Y, Liu L. Determination of the optimal mean arterial pressure for postbleeding resuscitation after hemorrhagic shock in rats. *Anesthesiology*. 2012;116(1):103-12.
93. Dubniks M, Grande PO. Change in plasma volume from a state of hyper-, normo- or hypovolemia with or without noradrenalin infusion in the rat. *Microvascular research*. 2008;76(2):75-9.
94. Vesey CJ, Cole PV, Simpson PJ. Cyanide and thiocyanate concentrations following sodium nitroprusside infusion in man. *British journal of anaesthesia*. 1976;48(7):651-60.
95. Bond RF, Johnson G, 3rd. Vascular adrenergic interactions during hemorrhagic shock. *Federation proceedings*. 1985;44(2):281-9.
96. Endrich B, Franke N, Peter K, Messmer K. Induced hypotension: action of sodium nitroprusside and nitroglycerin on the microcirculation. A micropuncture investigation. *Anesthesiology*. 1987;66(5):605-13.
97. Friesenecker BE, Tsai AG, Martini J, Ulmer H, Wenzel V, Hasibeder WR, et al. Arteriolar vasoconstrictive response: comparing the effects of arginine vasopressin and norepinephrine. *Critical care*. 2006;10(3):R75.
98. Russ MA, Prondzinsky R, Christoph A, Schlitt A, Buerke U, Soffker G, et al. Hemodynamic improvement following levosimendan treatment in patients with acute myocardial infarction and cardiogenic shock. *Critical care medicine*. 2007;35(12):2732-9.
99. Memis D, Inal MT, Sut N. The effects of levosimendan vs dobutamine added to dopamine on liver functions assessed with noninvasive liver function monitoring in patients with septic shock. *Journal of critical care*. 2012;27(3):318 e1-6.
100. Fries M, Ince C, Rossaint R, Bleilevens C, Bickenbach J, Rex S, et al. Levosimendan but not norepinephrine improves microvascular oxygenation during experimental septic shock. *Critical care medicine*. 2008;36(6):1886-91.
101. Morelli A, Donati A, Ertmer C, Rehberg S, Lange M, Orecchioni A, et al. Levosimendan for resuscitating the microcirculation in patients with septic shock: a randomized controlled study. *Critical care*. 2010;14(6):R232.
102. Kerger H, Saltzman DJ, Menger MD, Messmer K, Intaglietta M. Systemic and subcutaneous microvascular Po₂ dissociation during 4-h hemorrhagic shock in conscious hamsters. *The American journal of physiology*. 1996;270(3 Pt 2):H827-36.
103. Cabrales P, Nacharaju P, Manjula BN, Tsai AG, Acharya SA, Intaglietta M. Early difference in tissue pH and microvascular hemodynamics in hemorrhagic shock resuscitation using polyethylene glycol-albumin- and hydroxyethyl starch-based plasma expanders. *Shock*. 2005;24(1):66-73.

104. Villela NR, Tsai AG, Cabrales P, Intaglietta M. Improved resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's lactate with increased viscosity in the hamster window chamber model. *The Journal of trauma*. 2011;71(2):418-24.
105. Boerma EC, Koopmans M, Konijn A, Kaiferova K, Bakker AJ, van Roon EN, et al. Effects of nitroglycerin on sublingual microcirculatory blood flow in patients with severe sepsis/septic shock after a strict resuscitation protocol: a double-blind randomized placebo controlled trial. *Critical care medicine*. 2010;38(1):93-100.
106. Sobhian B, Jafarmadar M, Redl H, Bahrami S. Nitric oxide-supplemented resuscitation improves early gastrointestinal blood flow in rats subjected to hemorrhagic shock without late consequences. *American journal of surgery*. 2011;201(1):100-10.
107. Nachuraju P, Friedman AJ, Friedman JM, Cabrales P. Exogenous nitric oxide prevents cardiovascular collapse during hemorrhagic shock. *Resuscitation*. 2011;82(5):607-13.
108. von Dobschuetz E, Hutter J, Hoffmann T, Messmer K. Recombinant human hemoglobin with reduced nitric oxide-scavenging capacity restores effectively pancreatic microcirculatory disorders in hemorrhagic shock. *Anesthesiology*. 2004;100(6):1484-90.
109. Yu B, Volpato GP, Chang K, Bloch KD, Zapol WM. Prevention of the pulmonary vasoconstrictor effects of HBOC-201 in awake lambs by continuously breathing nitric oxide. *Anesthesiology*. 2009;110(1):113-22.
110. Donadee C, Raat NJ, Kaniyas T, Tejero J, Lee JS, Kelley EE, et al. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation*. 2011;124(4):465-76.
111. Poloujadoff MP, Borron SW, Amathieu R, Favret F, Camara MS, Lapostolle F, et al. Improved survival after resuscitation with norepinephrine in a murine model of uncontrolled hemorrhagic shock. *Anesthesiology*. 2007;107(4):591-6.
112. Nouria S, Elatrous S, Dimassi S, Besbes L, Boukef R, Mohamed B, et al. Effects of norepinephrine on static and dynamic preload indicators in experimental hemorrhagic shock. *Critical care medicine*. 2005;33(10):2339-43.
113. Lima R, Villela NR, Bouskela E. Microcirculatory effects of selective receptor blockade during hemorrhagic shock treatment with vasopressin: experimental study in the hamster dorsal chamber. *Shock*. 2012;38(5):493-8.
114. Onody P, Stangl R, Fulop A, Rosero O, Garbaisz D, Turoczi Z, et al. Levosimendan: a cardiovascular drug to prevent liver ischemia-reperfusion injury? *PloS one*. 2013;8(9):e73758.
115. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annual review of immunology*. 2010;28:321-42.
116. Muller WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circulation research*. 2009;105(3):223-30.

117. Xu DZ, Lu Q, Adams CA, Issekutz AC, Deitch EA. Trauma-hemorrhagic shock-induced up-regulation of endothelial cell adhesion molecules is blunted by mesenteric lymph duct ligation. *Critical care medicine*. 2004;32(3):760-5.
118. Shusterman N, Strom BL, Murray TG, Morrison G, West SL, Maislin G. Risk factors and outcome of hospital-acquired acute renal failure. *Clinical epidemiologic study*. *The American journal of medicine*. 1987;83(1):65-71.
119. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(7):1312-4.
120. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA, Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(19):10417-22.
121. Liu LM, Dubick MA. Hemorrhagic shock-induced vascular hyporeactivity in the rat: relationship to gene expression of nitric oxide synthase, endothelin-1, and select cytokines in corresponding organs. *The Journal of surgical research*. 2005;125(2):128-36.
122. Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW, et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Annals of surgery*. 1993;218(6):769-76.
123. Citron BA, Arnold PM, Sebastian C, Qin F, Malladi S, Ameenuddin S, et al. Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death. *Experimental neurology*. 2000;166(2):213-26.
124. Fu YC, Chi CS, Yin SC, Hwang B, Chiu YT, Hsu SL. Norepinephrine induces apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes through a reactive oxygen species-TNF α -caspase signaling pathway. *Cardiovascular research*. 2004;62(3):558-67.
125. Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A, et al. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(11):6823-6.
126. Soeding PF, Crack PJ, Wright CE, Angus JA, Royse CF. Levosimendan preserves the contractile responsiveness of hypoxic human myocardium via mitochondrial K(ATP) channel and potential pERK 1/2 activation. *European journal of pharmacology*. 2011;655(1-3):59-66.