

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**EFEITOS TARDIOS DA SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA
SOBRE A ESTRUTURA, FUNÇÃO E O ESTRESSE
OXIDATIVO HEPÁTICO EM RATOS SUBMETIDOS A
CHOQUE HEMORRÁGICO**

RICARDO ANTÔNIO HOPPEN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre
2004

**EFEITOS TARDIOS DA SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA
SOBRE A ESTRUTURA, FUNÇÃO E O ESTRESSE
OXIDATIVO HEPÁTICO EM RATOS SUBMETIDOS A
CHOQUE HEMORRÁGICO**

RICARDO ANTÔNIO HOPPEN

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Cirurgia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Otávio Corso

Porto Alegre

2004

H798e Hoppen, Ricardo Antônio
Efeitos tardios da solução salina hipertônica sobre a estrutura, função e o estresse oxidativo hepático em ratos submetidos a choque hemorrágico / Ricardo Antônio Hoppen ; orientado por Carlos Otávio Corso – 2004.
98 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

1. Choque hemorrágico 2. Isquemia 3. Reperusão
4. Estresse oxidativo 5. Ringer Lactato 6. Ressucitação
I. Corso, Carlos Otávio, orient. II. Título

CDU: 616-001.36

Catálogo na fonte: bibliotecária Daiane Citadin Raupp - CRB 14/887

À minha amada esposa Eliana, companheira de todos os momentos, por estar sempre presente e dedicar-se conjuntamente aos meus projetos de vida.

Aos meus adorados filhos Arthur, Victória e Diego pela constante retribuição de carinho.

Aos meus pais, Mauro e Zuleica, por terem transmitido a importância do conhecimento e do aperfeiçoamento constante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que de alguma maneira colaboraram para a conclusão desta dissertação de mestrado em especial a:

Ao Professor Doutor Carlos Otavio Corso, do Programa de Pós Graduação em Medicina – Cirurgia da UFRGS, por ter aceitado e conduzido a orientação deste e dos próximos trabalhos.

Ao Dr. Felipe Dal-Pizzol do Departamento de Bioquímica da UFRGS e Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, pela realização das análises bioquímicas.

À Dra Daniela Augustin Silveira pela confecção das lâminas, análise histopatológica e documentação fotográfica.

Ao amigo Antonio Severino, companheiro dos muitos experimentos, pela sua colaboração e apoio.

Aos amigos Dr. José Ivo Scherer e Dr. Nilton Bonadeo pela ajuda e incentivo no inicio do projeto de realização do mestrado.

Ao grande amigo Dr. Mario Henrique Osanai pelo irretribuível apoio logístico, atenuando a distância Passo Fundo – Porto Alegre.

Ao companheiro de orientação Dr. Tomaz Grezzana pelo auxílio técnico e pela parceria científica iniciada.

Aos meus colegas Dr. Jorge Anunciação e Dr. Renato Borba sem os quais muitas das viagens não teriam sido possíveis.

Ao Professor Heitor Verardi da Faculdade de Medicina da Universidade de Passo Fundo pela orientação no primeiro trabalho de Iniciação Científica o qual despertou o interesse pela pesquisa experimental.

***“Somos o que repetidamente fazemos.
A excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito.”
(Aristóteles)***

RESUMO

INTRODUÇÃO: A ressuscitação volêmica do choque hemorrágico (CH) é um evento que acentua uma série de reações em cascata, com ativação celular generalizada e liberação de potentes agentes pró-inflamatórios que podem contribuir para alterações no fluxo sanguíneo na microcirculação e prejuízos no aporte nutricional aos tecidos. Atualmente muitos resultados têm mostrado os benefícios da ressuscitação com pequenos volumes de solução salina hipertônica a 7,5% (SSH) sobre a microcirculação e na atenuação do dano oxidativo. O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos tardios (após 6 horas) da ressuscitação com SSH e com Ringer Lactato (RL) sobre a função, integridade e estresse oxidativo hepático. **MATERIAL E MÉTODOS:** ratos Wistar foram submetidos a choque hemorrágico controlado com PAM de 45 mmHg. Após 60 minutos de choque os animais foram divididos em dois grupos: Grupo RL: ressuscitado com RL 4 vezes o volume sanguíneo perdido; Grupo SSH: ressuscitado com SSH 7,5 % em 2 minutos, 10% do volume sanguíneo perdido. Após 6 horas de recuperação os animais foram novamente anestesiados, submetidos à laparotomia e o ducto colédoco canulado. Avaliou-se a pressão arterial média (PAM), a frequência cardíaca (FC) e o hematócrito (HT). As defesas antioxidantes mensuradas no tecido hepático foram a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). A função hepática foi avaliada pela quantificação do fluxo biliar. Bilirrubinas, alanino aminotransferase (ALT) e o escore histopatológico de lesão foram os parâmetros avaliados quanto à integridade hepática. O estresse oxidativo foi determinado através das dosagens da mieloperoxidase (MPO), das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da proteína carbonilada. **RESULTADOS:** após 6 horas de ressuscitação os animais não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros macro-hemodinâmicos (PAM, FC, HT). Os níveis de ALT e das bilirrubinas foram significativamente menores no grupo SSH ($p < 0,001$). O fluxo biliar apresentou significativa elevação no grupo SSH ($p < 0,05$). As defesas antioxidantes (CAT e SOD) não apresentaram variações significativas. O grupo SSH apresentou valores menores de mieloperoxidase, de TBARS e da proteína carbonilada ($p < 0,001$) em comparação ao grupo RL. O escore total de lesão histopatológica foi significativamente menor no grupo SSH ($p < 0,05$). **CONCLUSÃO:** no nosso modelo de CH a SSH atenuou o estresse oxidativo hepático após 6 horas da ressuscitação, assim como induziu a recuperação da função e demonstrou menor dano ao parênquima hepático.

ABSTRACT

BACKGROUND: The resuscitation with small volume of a NaCl 7,5% (Hypertonic Saline Solution) solution has been demonstrating good results in decreasing oxidative stress in the liver microcirculation after hemorrhagic shock. The aim of this paper is to compare the latter effects (after 6 hours) of the NaCl 7,5% resuscitation and the Lactate Ringer solution on the hepatic function, structure and oxidative stress. **MATERIALS AND METHODS:** male Wistar rats were submit to controlled hemorrhagic shock (Mean Arterial Pressure-MAP = 45 mmHg) over 60 minutes and then resuscitated whit HSS (10% of blood sham) or LR (4 times the blood sham). The MAP, the heart rate (HR) and the hematocrit (HT) was evaluated. The antioxidant defenses measured were catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). Bile flow was used to evaluate hepatic function. The liver integrity was checked through serum billirubins, alanine aminotranferase (ALT) and by the injury histopathologic score. The oxidative stress was determined through the levels of myeloperoxidase (MPO), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl. **RESULTS:** there was no difference in the MAP, HR and HT results between the groups. In the HSS group the levels of billirubins and ALT were smaller than in the LR group ($p < 0,001$). The bile flow showed improvement in the HSS group ($p < 0,05$). The antioxidant defenses have not shown variations. The HSS group had small levels of MPO, TBARS and protein carbonyl. The injury histopathological score was significantly lower in the SSH group ($p < 0,05$). **CONCLUSIONS:** the HSS alleviated the oxidative stress after 6 hours of resuscitation as well as maintained the hepatic function and integrity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Mecanismo de produção dos RLO após I/R	21
Figura 02	Esquema gráfico das interações entre leucócitos, endotélio e moléculas de adesão	25
Figura03	Esquema do mecanismo fisiopatológico da lesão I/R	28
Figura 04	Representação esquemática do mecanismo fisiológico de resposta hemodinâmica à ressuscitação hipertônica.....	34
Figura 05:	Delineamento gráfico do protocolo experimental	44
Figura 06:	Variação do fluxo biliar entre os grupos RL, SSH e controle.....	55
Figura 07:	Variação dos níveis de Alanino Aminotransferase sérica, basais (T0) e após 6 horas (T6) de ressuscitação, nos grupos RL e SSH	57
Figura 08:	Variação nos níveis de bilirrubinas séricas nos tempos basais (T0) e ao final do experimento (T6).....	58
Figura 09:	Variação na atividade da catalase nos grupos RL, SSH e controle.....	59
Figura 10:	Variação na atividade da superóxido dismutase entre os grupos RL, SSH e controle.....	60
Figura 11:	Variação na atividade da mieloperoxidase nos grupos RL, SSH e controle.....	61

- Figura 12: Níveis basais e após 6 horas de ressuscitação das Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico – TBARS – sérico nos grupos RL e SSH..... 62
- Figura 13: Quantificação do dano oxidativo às proteínas plasmáticas – proteína carbonilada – nos grupo RL e SSH..... 64
- Figura 14 . Área de necrose hepática margeada por infiltrado polimorfonuclear (setas finas). H.E. com magnificação de 400 vezes..... 67
- Figura 15. Veia pós-sinusoidal com áreas de necrose (setas estreitas), infiltrado polimorfonuclear (seta larga) e dilatação sinusoidal (estrela cheia). H.E. com magnificação de 200 vezes..... 67
- Figura 16. Veia pós-sinusoidal com leucócitos na luz vascular (estrela), aderidos ao endotélio (setas finas) e infiltrados no interstício (setas largas). H.E. com magnificação de 400 vezes..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 01:	Composição da solução de Ringer com Lactato.....	29
Tabela 02:	Escore de quantificação da lesão histopatológica.....	49
Tabela 03:	Médias dos pesos dos animais.....	51
Tabela 04:	Variação dos níveis de Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC) e Hematócrito (HT) dos experimentos.	54
Tabela 05:	Resultados dos escores de Lesão Histopatológica nos grupos RL, SSH e controle.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AST: alanino aminotransferase

ATP: Adenosina Tri Fosfato

bpm: batimentos por minuto

Ca⁺: cálcio

CAT: catalase

EP: erro padrão

ET: endotelinas

FC: frequência cardíaca

H₂O: água

H₂O₂: Radical peróxido de hidrogênio

HE: hematoxila-eosina

Hg: mercúrio

HT: hematócrito

I/R: Isquemia e reperfusão

ICAM: molécula de adesão intercelular

IL: interleucina

K⁺: potássio

MAC: moléculas de adesão celular

MDA: malondialdeído

mm: milímetros

mM: milimóis

mOsm: miliosmóis

MPO: mieloperoxidase

Na⁺: sódio

NO: óxido nítrico

O₂⁻: ânion superóxido

O₂: Oxigênio

OH⁻: radical hidroxila

PAF: fator de ativação plaquetária

PAM: pressão arterial média

PMN: polimorfonucleares

RL: Ringer lactato

RLO: Radicais Livres do Oxigênio

SOD: Superóxido Dismutase

SS: solução salina (NaCl)

SSH: solução salina hipertônica

T0: tempo zero (basal) do experimento

T6: tempo 6 horas

TBARS: radical tóxico do ácido tiobarbitúrico

TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

XOD: Xantino Oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O Choque Hemorrágico	16
1.2 A Lesão Hepática de Isquemia e Reperusão (I/R)	18
1.3 Os Cristalóides na reposição volêmica	28
Terapia de Ressuscitação com Pequenos Volumes ("Small-Volume Resuscitation")	32
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Animais e Procedimento Cirúrgico.....	40
3.2 Protocolo Experimental	42
3.3 Dosagens Laboratoriais	45
3.3.1 <i>Determinação da Alanino Aminotransferase (ALT) e das Bilirrubinas</i>	45
3.3.2 <i>Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e da Catalase (CAT)</i>	45
3.3.3 <i>Mieloperoxidase (MPO)</i>	46
3.3.4 <i>Medida das Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico – TBARS</i>	46
3.3.5 <i>Medida do dano oxidativo em proteínas – Proteína Carbonilada</i>	46
3.4 Análise Histopatológica	47
3.5 Análise Estatística.....	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Peso dos Animais	51
4.2 Pressão Arterial Média, Frequência Cardíaca e Hematócrito.....	52
4.3 Peso dos Fígados e Fluxo Biliar	55
4.4 Alanino Aminotransferase (ALT) e Bilirrubinas.....	56
4.5 Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD).....	58
4.6 Mieloperoxidase (MPO).....	60
4.7 Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	62
4.8 Proteína Carbonilada	63
4.9 Análise Histopatológica	64
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Choque Hemorrágico

Define-se choque como a evidência clínica de perfusão inadequada de órgãos e tecidos (ATLS - American College of Surgeons, 1997). A deficiência primária da perda de volume durante o choque hemorrágico é a perda do volume intravascular resultando em retorno venoso inadequado. (Pacheco, Jr. et al., 1994) A hemorragia predomina no paciente politraumatizado como causa de choque e de mortes evitáveis (Deitch et al., 2003). O sucesso do tratamento do choque hemorrágico inclui o controle cirúrgico da hemorragia e a restauração de perfusão tecidual.(ATLS - American College of Surgeons, 1997).

O choque hemorrágico associado ao trauma permanece como a principal causa de morte da população abaixo dos 40 anos nos países ocidentais, além de persistir como uma das maiores causas de morte do paciente politraumatizado em geral. (National Center for Health Statistics, 2003)

Em 1975 Baue descreveu a síndrome de disfunção múltipla, progressiva ou seqüencial dos sistemas associada ao choque, inflamação ou sepse (Durham et al., 2003). Além das mortes imediatas causadas pela perda volêmica aguda, o choque hemorrágico é responsável por uma curva tardia de mortalidade, como conseqüência da falência de múltiplos órgãos e/ou sepse (Giannoudis, 2003).

Estudos têm demonstrado que a hemorragia por si só é causa significativa de imunossupressão, podendo facilitar a sepse (Pacheco, Jr. et al., 1994; Wang and Chaudry, 1991).

O tempo que o paciente permanece hipovolêmico é fundamental para o resultado final do tratamento. Em pacientes que sobrevivem ao trauma inicial, a restauração de volume de rotina resulta em normalização macro-hemodinâmica, mas os distúrbios da microcirculação, isto é, o prejuízo do fluxo sanguíneo nutricional, pode não ser adequadamente corrigido pela simples reposição de fluidos (Messmer K and Kreimeier U, 1989; Wang et al., 1992).

O choque hemorrágico determina uma série de alterações microcirculatórias e celulares que levam ao comprometimento da perfusão tecidual e prejudicam a troca de nutrientes e metabólitos. Como resultado ocorre acidose, diminuição da viscosidade sanguínea, edema de células endoteliais e dos tecidos extravasculares, hemoconcentração e agregação dos eritrócitos, e ativação dos neutrófilos e macrófagos, tendendo ao estabelecimento de um ciclo vicioso fatal, se não tratado rápida e adequadamente (Kreimeier et al., 1993; Serracino-Inglott et al., 2001).

O mais importante e precoce sinal de lesão isquêmica é a diminuição nos níveis de ATP (Corso et al., 1998). Como consequência, a função da bomba Na^+/K^+ da membrana plasmática é prejudicada, levando a entrada de água e sódio na célula, acarretando edema celular, particularmente do endotélio vascular. O edema do endotélio pode causar estreitamento e mesmo obstrução do lúmen capilar. Este processo resulta em elevação da resistência hidráulica;

conseqüentemente o fluxo sangüíneo é dirigido para os segmentos microcirculatórios com baixa resistência, resultando em perfusão heterogênea, uma marca da microcirculação no choque (Corso et al., 1998;Kretschmar and Engelhardt, 1994;Menger et al., 1992b). Portanto, não apenas as alterações microcirculatórias e celulares deflagradas pelo choque hemorrágico são importantes, mas também a ativação do complemento e outros sistemas contribuirão para a persistência e agravamento da falência da perfusão nutritiva microvascular e da função orgânica (Messmer K and Kreimeier U, 1989).

A falência microvascular e a depressão do metabolismo energético celular podem persistir apesar da ressuscitação adequada. Estes pacientes podem desenvolver falência orgânica múltipla, sendo o fígado o segundo órgão mais freqüentemente envolvido nesta disfunção após choque hemorrágico severo ou prolongado.(Paxian et al., 2003)

1.2 A Lesão Hepática de Isquemia e Reperfusão (I/R)

A ativação celular generalizada e o estado de baixo fluxo que se seguem ao choque hemorrágico e à ressuscitação subsequente são considerados uma forma global de Isquemia e Reperfusão (I/R) (Eversole et al., 1993).

O paradoxo da vida aeróbica é que o oxigênio pode exercer função essencial como também deletéria para a atividade celular. O metabolismo aeróbico depende de uma variedade de mecanismos de defesa antioxidantes. As

principais enzimas anti-oxidantes naturais são a Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase e a Catalase (CAT) (Schwedhelm et al., 2003). Os níveis de SOD, CAT e glutatião reduzido (GSH) indicam o status antioxidante do tecido hepático. Os radicais O_2^- são eliminados pela SOD e os radicais H_2O_2 pela CAT (Koken et al., 2004).

Os Radicais Livres do Oxigênio (RLO) desempenham um papel importante no desenvolvimento da lesão microvascular associada com I/R, sendo a enzima xantino oxidase (XOD) a maior fonte de formação de radicais pós-isquemia.(Adkison et al., 1986;Menger et al., 1992b;Samarasinghe et al., 2000). Estudos usando alopurinol, um inibidor da xantina oxidase, demonstraram significativa redução da liberação de transaminases assim como prevenção da depressão do consumo de oxigênio hepático provocado pela I/R.(Adkison et al., 1986)

O mecanismo de geração de RLO pela XOD foi descrito por Granger et al: durante o período de isquemia o ATP no citoplasma celular é catabolizado em hipoxantina, que se acumula na célula, e a xantina desidrogenase é convertida em XOD. Quando o tecido é reperfundido, o oxigênio molecular reage com a hipoxantina em uma reação catalisada pela XOD produzindo o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^-). A depleção das reservas de ATP e a mudança do metabolismo de aeróbico para anaeróbico resultam em aumento do lactato tecidual e queda do pH tecidual. (Granger et al., 1986b). Essas reações estão ilustradas na Figura 01.

A reintrodução do oxigênio molecular após um período de isquemia agrava a lesão iniciada pelo próprio processo isquêmico, levando à conversão da hipoxantina em ácido úrico e disparando uma cascata de reações que liberam os RLO. A exposição das membranas celulares plasmáticas aos RLO produzidos em excesso desencadeia o processo de peroxidação das membranas, o qual pode resultar em morte celular. Neste processo, as cadeias laterais dos ácidos graxos e dos fosfolípidios das membranas celulares são oxidadas a hidroperóxidos, os quais, na presença do íon ferro, se decompõe para formar compostos citotóxicos que degradam as proteínas e inativam as enzimas sulfidrilas da membrana. Ocorre mudança da estrutura e da permeabilidade da parede celular resultando em potencial dano tecidual. (Granger et al., 1986a;Koken et al., 2004;Planas and Garcia, 1997)

As células endoteliais são o alvo primário da lesão de I/R. Os neutrófilos ativados aderidos às células lesadas do endotélio são igualmente fonte de RLO. Um estudo realizado com cultura de células endoteliais demonstrou a importância das defesas antioxidantes endógenas na prevenção do dano endotelial causado pelos RLO (Samarasinghe et al., 2000).

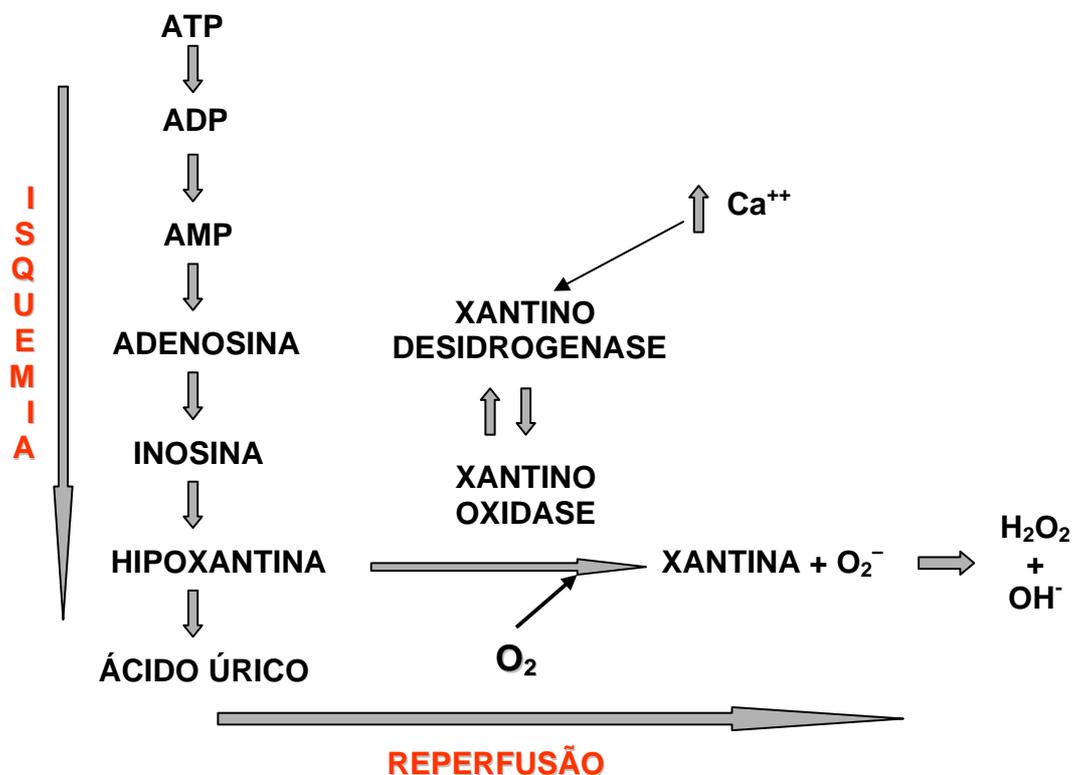


Figura 01: mecanismo de produção dos RLO após I/R.

A formação do ânion superóxido está diretamente relacionada com a reperfusão e com a lesão celular, sendo a peroxidação das membranas plasmáticas mais acentuada em tecidos hepáticos previamente submetidos à isquemia. (Walsh et al., 1990). A localização do estresse oxidativo dentro do parênquima hepático é diferente e varia de acordo com a duração da reperfusão. Essa heterogeneidade deve-se à localização dos varredores endógenos de RLO (Kato et al., 2001).

A lesão resultante da isquemia, principalmente na região centrolobular hepática, que ocorre nas duas primeiras horas parece ser reversível. Entretanto,

após 3 horas de isquemia, as lesões são vistas em todo o parênquima hepático, da região centrolobular até a área periportal, e são completamente irreversíveis (Adkison et al., 1986;Kato et al., 2001).

Há duas fases da lesão hepática por I/R: uma fase precoce (1 a 6 horas pós reperfusão) e uma fase tardia (6 a 24 horas pós reperfusão). A fase inicial caracteriza-se pela geração de RLO, ativação das células de Kupffer e ativação inicial dos neutrófilos polimorfonucleares (PMN). A fase tardia caracteriza-se pelo estado de intensa ativação dos PMN e suas respostas biomoleculares (Martinez-Mier et al., 2000). Os PMN são os mediadores chaves da resposta celular citotóxica (Corso et al., 1998;Corso et al., 1999). Participam da lesão de I/R pela liberação de proteases (elastase, mieloperoxidase, etc...) e RLO (Pascual et al., 2002;Serracino-Inglott et al., 2001).

A disfunção microvascular se inicia com a ativação leucocitária e subsequente adesão ao endotélio vascular com reações exacerbadas (Ciesla et al., 2000;Ciesla et al., 2001;Menger et al., 1992b). A ativação celular exagerada dos neutrófilos, macrófagos e endotélio, e suas exacerbadas interações, podem ser responsáveis pela liberação sistêmica de produtos tóxicos que alteram a integridade e a permeabilidade microvascular (Pascual et al., 2003).

A falência microcirculatória hepática resultante dos estágios iniciais da reperfusão decorre do edema das células endoteliais, vasoconstrição, estagnação e agregação leucocitária dentro dos sinusóides. O edema endotelial e das células de Kupffer é conseqüente à falência dos mecanismos de transporte transmembranas, secundária a deficiência nutritiva induzida pela isquemia. Ocorre

vasoconstrição resultante da deficiência no balanço entre óxido nítrico (NO) e endotelinas (ET) levando ao estreitamento da luz capilar e diminuição na velocidade dos leucócitos. O contato entre endotélio e leucócitos fica mais freqüente havendo então a estase e aderência leucocitária com diminuição generalizada do fluxo na rede microcirculatória hepática, mantendo áreas isquêmicas do tecido mesmo após o início da reperfusão. A ativação dos neutrófilos com produção de RLO e citocinas, associada à ativação precoce das células de Kupffer, agrava e pode perpetuar o processo de lesão tecidual hepática (Serracino-Inglott et al., 2001).

O complexo fenômeno da lesão microvascular induzida pela I/R segue dois mecanismos fisiopatológicos distintos: o não refluxo (“no reflow”) e o refluxo paradoxal (“reflow paradox”). Entende-se por “no reflow” a deficiência na perfusão primária dos capilares da microcirculação com início da ativação leucocitária e do endotélio, e por “reflow paradox” a firme intensificação da adesão leucocitária ao endotélio vascular, liberando mediadores inflamatórios e conseqüente disfunção na permeabilidade deste endotélio. O “reflow paradox” ocorre após os capilares serem parcialmente liberados do chamado “no reflow” ocorrendo piora progressiva na perfusão capilar. O edema endotelial levando a aumento da resistência hidráulica pode ser considerado como uma manifestação morfológica do fenômeno “no reflow” (Menger et al., 1992b; Menger et al., 1992a)

O processo de recrutamento dos PMN envolve vários passos: ativação celular, contato inicial, adesão ao endotélio, migração trans-endotelial e liberação de enzimas e mediadores inflamatórios no parênquima provocando lesão. Neste

processo ocorre a ativação e aumento na expressão de uma variedade de moléculas inflamatórias (citocinas, fatores de transcrição nuclear) levando ao aumento na expressão das Moléculas de Adesão Celular (MAC) na superfície dos PMN e nas células endoteliais (Martinez-Mier et al., 2000).

Estudos recentes demonstraram que não apenas os RLO são causadores de lesão tecidual, mas também conduzem à perpetuação da resposta inflamatória com o aumento na expressão das MAC e a geração de fatores quimiotáticos.(Jarrar et al., 2000)

Após o insulto inicial, em uma primeira fase, ocorre a ativação dos neutrófilos e do endotélio com diminuição da velocidade de fluxo na circulação e contatos ocasionais neutrófilos-endotélio. Configura-se o fenômeno denominado de rolamento ou “rolling”, o qual é mediado pelas selectinas, moléculas de adesão celular (MAC). A L-selectina é uma molécula expressa continuamente na superfície dos neutrófilos, podendo ter sua expressão e avidéz rapidamente aumentadas. A P-selectina e a E-selectina são encontradas na superfície das células endoteliais e somente são expressas quando o endotélio está ativado, como na isquemia e reperfusão. Após essas ligações iniciais fracas segue-se a segunda fase, caracterizada pela adesão firme dos leucócitos ao endotélio através da interação das beta-integrinas (principalmente a CD18/CD11b) com as imunoglobulinas do endotélio (principalmente a ICAM1 – Molécula de Adesão Intercelular 1). O terceiro passo é a migração dos leucócitos para o tecido intersticial através da diapedese. O processo de rolamento, adesão e migração ocorre nas veias pós sinusoidais hepáticas (McEver, 1992;Pascual et al.,

2002;Pascual et al., 2003). Este processo está esquematicamente representado na Figura 02.

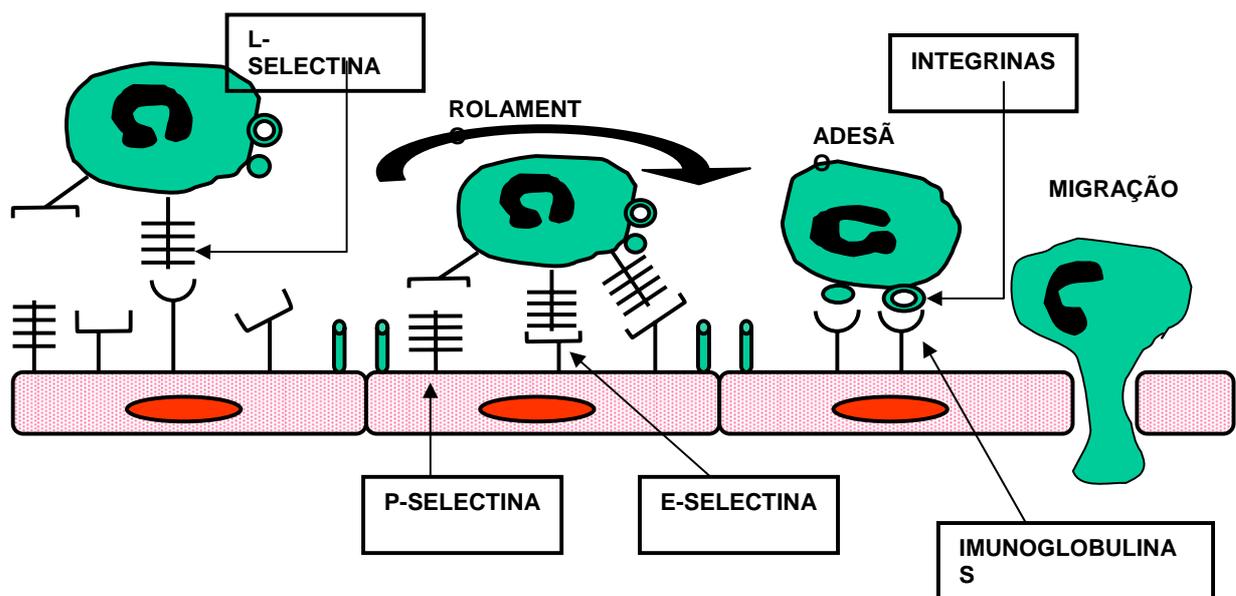


Figura 02: Esquema gráfico das interações entre leucócitos, endotélio e moléculas de adesão

O fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), a Interleucina-1 (IL-1) e a Interleucina-6 (IL-6) são as principais citocinas mediadoras da resposta inicial ao choque que estão envolvidas na lesão hepática por I/R (Chaudry et al., 2003; Corso et al., 1998; Giannoudis, 2003; Gurfinkel et al., 2003; Sakamoto et al., 2002; Serracino-Inglott et al., 2001). Recentemente foi demonstrado que o Fator de

Ativação Plaquetária (PAF) participa de maneira importante e precoce nesta seqüência inflamatória (Yamakawa et al., 2000).

As citocinas antiinflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13) atuam na diminuição da expressão das citocinas pró-inflamatórias. A resposta pró-inflamatória exacerbada leva à resposta inflamatória sistêmica (Giannoudis, 2003).

A IL-1 e o TNF-alfa são potentes agentes pró-inflamatórios detectados precocemente, imediatamente após o choque. Induzem a síntese da IL-8, importante fator quimiotático na atração dos PMN, que promove o aumento na expressão das moléculas de adesão celular aumentando ainda mais as interações leucócito / endotélio, interações estas que resultam no aumento da produção de citocinas. A IL-8 está envolvida na degranulação e reações oxidativas exacerbadas dos PMN, podendo aumentar a permeabilidade endotelial. O TNF-alfa induz a geração local de fatores quimiotáticos e de ativação leucocitária e faz com que as células de Kupffer gerem radicais superóxidos (Liener et al., 2002; Serracino-Inglott et al., 2001).

O TNF-alfa e a IL-1 são responsáveis pelo aumento na expressão da ICAM-1 nas células endoteliais (Sakamoto et al., 2002).

As células de Kupffer em situação basal produzem pequenas quantidades de citocinas pró-inflamatórias (efeito modulatório) porém, quando ativadas, liberam grandes quantidades destas citocinas, principalmente TNF-alfa, IL-1 e IL-6. Esta ativação das células de Kupffer parece ser a fonte principal na geração de RLO e outros metabólitos na fase inicial da lesão de reperfusão (Corso et al., 1998).

As células de Kupffer são macrófagos grandes e fixos que, quando ativados, geram uma gama enorme de mediadores inflamatórios incluindo citocinas, proteases e RLO. Estas células exercem um papel crucial na patogênese da lesão de I/R.(Sakamoto et al., 2002;Serracino-Inglott et al., 2001). Compreendem cerca de 85% dos macrófagos humanos e sua ativação desencadeia uma resposta inflamatória que não se restringe apenas ao fígado mas torna-se sistêmica(Corso et al., 1998)

O mecanismo fisiopatológico da lesão de I/R é resumidamente esquematizado na Figura 03.

A lesão causada pela liberação exacerbada dos RLO também atinge as proteínas. Os marcadores de oxidação protéica mais estudados são a formação de grupos de proteína carbonila, os quais resultam do insulto oxidativo primário. Os níveis das Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e da proteína carbonilada são usados para determinar os índices de peroxidação lipídica e de oxidação protéica respectivamente.(Griffiths and Aldred, 2004;Koken et al., 2004)

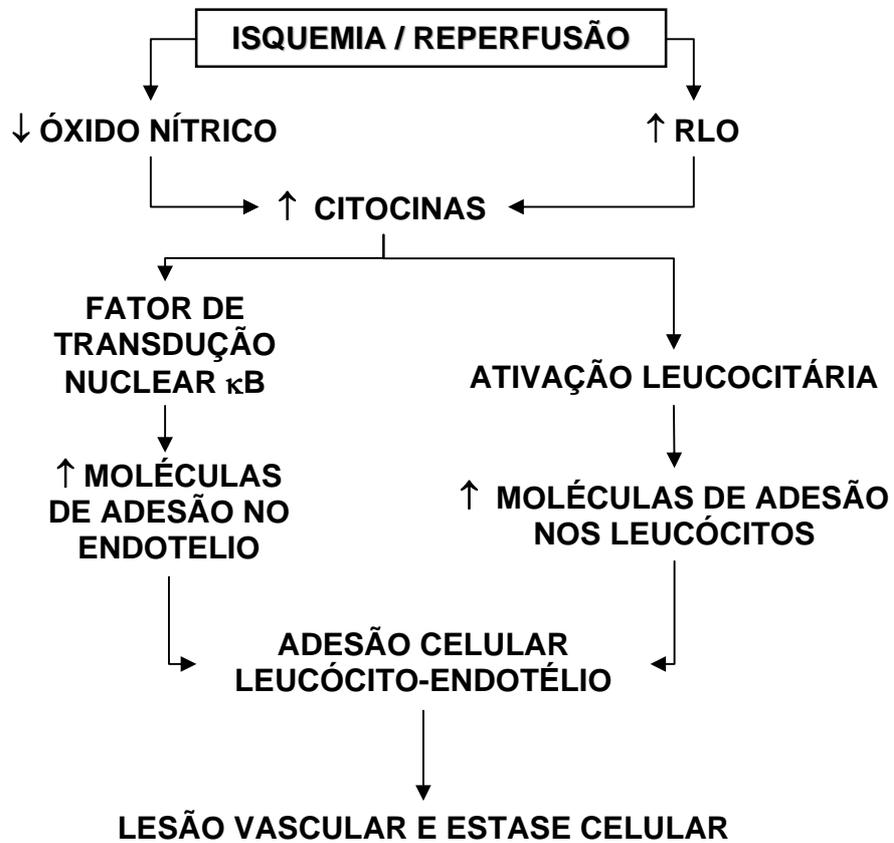


Figura 03: Esquema do mecanismo fisiopatológico da lesão I/R. Adaptado de Martinez-Mier (2000).

1.3 Os Cristalóides na Reposição Volêmica

Há 30 anos, durante a guerra do Vietnã, foi estabelecido o protocolo padrão para o uso de soluções cristalóides (Solução Salina 0,9% e Solução de Ringer

com Lactato) na ressuscitação do choque hemorrágico. Resultados de duas metanálises indicam que, em pacientes traumatizados, a ressuscitação com cristalóides está associada à menor mortalidade quando comparada aos colóides. (Choi et al., 1999; Schierhout and Roberts, 1998). Recentemente, outra metanálise concluiu que não há diferença entre as soluções no que tange à mortalidade. (Alderson et al., 2000)

Atualmente o guia para a reposição volêmica mais utilizado na literatura americana é o Suporte Avançado de Vida no Trauma (ATLS). (Rizoli, 2003) O guia ATLS preconiza que a reposição volêmica ao traumatizado seja agressiva utilizando-se, em adultos, 1 a 2 litros de solução cristalóide em bolus, preferencialmente a solução de Ringer com Lactato (RL). (ATLS - American College of Surgeons, 1997)

A solução de RL, com a fórmula atualmente empregada (tabela 01), foi proposta por Hartmann e Senn para a correção da acidose causada pelo choque. Sua osmolaridade é 276 mOsm/l. (Koustova et al., 2002).

Ringer Lactato e Solução Salina 0,9% (SS) são consideradas, freqüentemente, equivalentes em efeito para a reposição volêmica no choque. Porém, quando comparados resultados, animais tratados com SS apresentaram acidose metabólica severa com colapso cardiovascular secundário devido à acidose hiperclorêmica. Os resultados mostram que o RL oferece alguma proteção ao desenvolvimento deste tipo de complicação sendo, portanto, superior a SS para uso na reanimação e restabelecimento dos parâmetros macro-

hemodinâmicos (McFarlane and Lee, 1994; Scheingraber et al., 1999; Williams et al., 1999).

Apesar de restabelecer os parâmetros macro-hemodinâmicos, estudos recentes demonstraram que o RL afeta profundamente a resposta imune através da modulação da função leucocitária e na regulação gênica dos leucócitos à nível de transcrição (Koustova et al., 2002).

Ringer Lactato	mg/100ml	MEq/l
NaCl	600	130
KCl	30	4
CaCl ₂ .2H ₂ O	20	2,7
Lactato	300	

Tabela 01. Composição da solução de Ringer com Lactato

O esquema de ressuscitação com RL usando a regra de repor cada ml de sangue perdido com 3 a 4 ml de RL demonstrou restaurar o débito cardíaco, porém sem mantê-lo por um período de tempo prolongado. Fatores que podem estar envolvidos na depressão secundária e tardia do débito cardíaco são: diminuição do volume sanguíneo circulante após ressuscitação com RL, depressão prolongada do fluxo sanguíneo microvascular, aumento das ET, alteração nos receptores adrenérgicos, modulação pelo TNF-alfa e disfunção cardiovascular (Wang and Chaudry, 1991). Permanece em discussão a

possibilidade do RL exacerbar a acidose láctica do choque pela administração de uma solução contendo lactato (Koustova et al., 2002).

A reposição do volume sanguíneo perdido com solução de RL, de acordo com o protocolo do ATLS, primariamente ocupa o compartimento intravascular. Devido às características hiposmolares do cristalóide, este volume repostado passa a ocupar, posteriormente, o interstício, sendo o edema tecidual uma complicação esperada neste protocolo. Após a infusão de um litro de RL apenas 250 ml permanecerão no intravascular, sendo o restante difundido para o interstício (Rizoli, 2003). Na prática, apenas 10% a 20% do volume de cristalóide infundido permanecerá na circulação (Kramer, 2003). Além disso, grandes volumes de solução salina isotônica podem ser deletérios, resultando em ativação e sequestração de leucócitos, início da cascata da inflamação, edema e piora dos padrões de perfusão e oxigenação (Gurfinkel et al., 2003; Rizoli et al., 1999).

Animais ressuscitados com RL tiveram a ativação leucocitária aumentada após choque hemorrágico. No mesmo estudo, os animais que não sofreram o choque e apenas foram perfundidos com RL também apresentaram uma maior resposta tóxica dos leucócitos. Isso demonstra que a infusão de RL pode não ser inócua (Rhee et al., 1998).

Também é atribuído à ressuscitação com RL a redução dos leucócitos circulantes (leucopenia), possivelmente devido ao aumento das interações entre leucócitos e endotélio (Pascual et al., 2002).

Têm-se atribuído à ressuscitação com RL de animais submetidos a choque hemorrágico a indução imediata de apoptose tanto no fígado como no intestino delgado (Deb et al., 1999).

1.4 Terapia de Ressuscitação com Pequeno Volume (“Small-Volume Resuscitation”)

Em 1980 foram publicados os primeiros estudos sobre a Solução Salina Hipertônica (SSH) por pesquisadores da Universidade de São Paulo. Neste trabalho, em cães, foi demonstrado que a SSH a 7,5% (2400 mOsm/L), infundida rapidamente, num total de 10% do volume sangüíneo perdido, imediatamente restaurou a pressão arterial e o débito cardíaco a valores basais (Velasco et al., 1980). Também neste ano pesquisadores brasileiros publicaram resultados sobre o uso da SSH em 12 pacientes com choque hemorrágico não responsivo à infusão de grandes volumes de cristalóides. Este estudo demonstrou claramente os efeitos da SSH na melhora da resposta hemodinâmica. (Felippe J. et al., 1980)

Ainda no início da década de 80 outros pesquisadores demonstraram que os efeitos provocados pela infusão da solução de NaCl 7,5% em bolus em 2 minutos relatados por Velasco e cols. eram transitórios (Kramer, 2003). Desta maneira, foi sugerida a adição de um colóide visando aumentar o tempo de ação da solução hipertônica (Kreimeier et al., 1993).

O conceito da “ressuscitação com pequeno volume” foi criado por Nakayama e cols para esse regime de ressuscitação que teve seus primeiros

estudos publicados nos anos 60 e que ressurgiu nos anos 80 (Nakayama et al., 1984a).

Diversos pesquisadores vêm demonstrando ao longo dos anos que a infusão rápida, em 2 a 5 minutos, de 4 ml/Kg de uma solução de NaCl 7-7,5% são suficientes para restaurar o débito cardíaco e a perfusão orgânica quase que instantaneamente a valores pré-choque. (Mattox et al., 1991; Vassar et al., 1993; Wade et al., 1997; Younes et al., 1997)

Esta terapia baseia-se na mobilização instantânea da água endógena, principalmente do compartimento intracelular, através do potente gradiente osmótico criado pela SSH, primeiramente do endotélio e dos eritrócitos e posteriormente do interstício, para o compartimento intravascular. Os efeitos na ressuscitação primária do choque hemorrágico com SSH associada ou não a um colóide podem ser resumidos em (Kreimeier and Messmer, 2002):

- rápido aumento do volume plasmático, em 3 a 4 vezes o volume de solução hipertônica infundido;
- redução do volume das células endoteliais aumentando o diâmetro dos vasos da microcirculação com conseqüente melhora do fluxo sanguíneo;
- aumento imediato da pressão arterial sistêmica e do débito cardíaco; a resistência vascular periférica é reduzida;
- aumento instantâneo do fluxo sanguíneo nutricional com redução da lesão de reperfusão pós-isquêmica;
- restauração da função orgânica;
- aumento da taxa de sobrevivência.

A infusão de 250 ml da SSH a 7,5%, em 2 a 5 minutos, promove uma expansão do volume plasmático em 1000 ml (Rizoli, 2003).. Atuando desta maneira a SSH atenua o edema celular, causado pelo choque hemorrágico e seus mediadores, e suas conseqüências (Kreimeier and Messmer, 2002; Pacheco, Jr. et al., 1994).

A figura 04 representa esquematicamente o mecanismo fisiológico de resposta hemodinâmica a ressuscitação hipertônica.

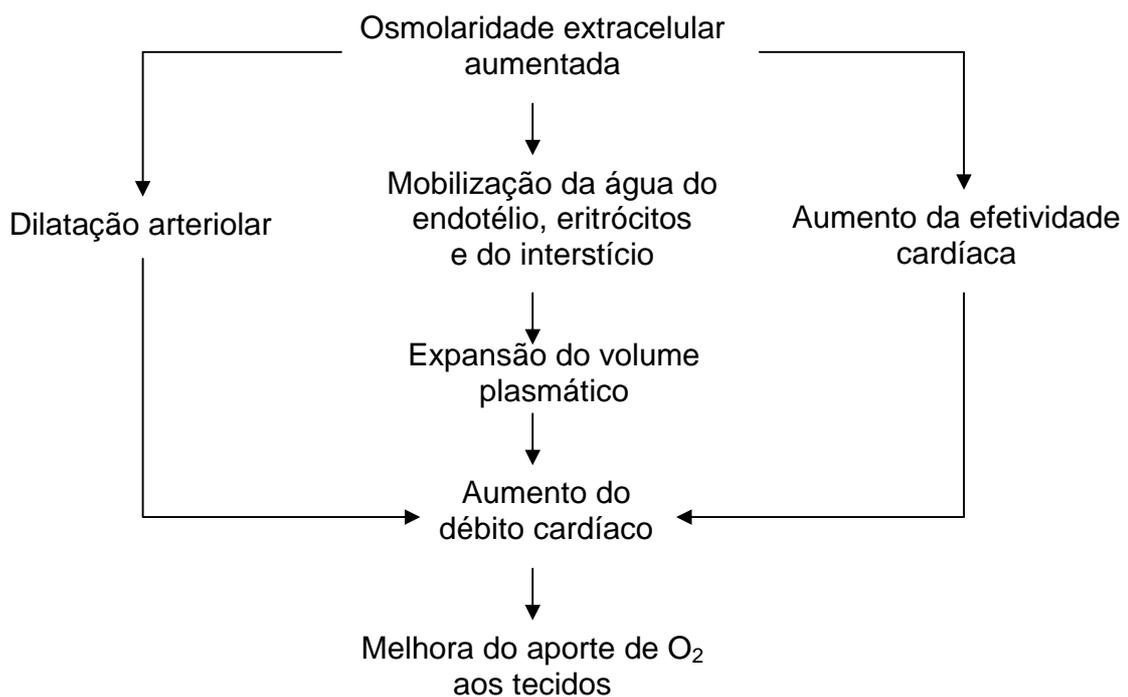


Figura 04. Representação esquemática do mecanismo fisiológico de resposta hemodinâmica à ressuscitação hipertônica. Adaptado de Kramer (2003).

Devido à membrana celular ser flexível e altamente permeável à água, a água move-se rapidamente do intracelular para o intravascular para que ocorra o equilíbrio osmótico e para aliviar as forças desta pressão. Um aumento da osmolaridade plasmática de 30 para 50 mOsm gera um gradiente de pressão osmótica através da parede celular de 500 a 1000 mmHg (Kramer, 2003).

A ressuscitação com SSH é associada com melhora da sobrevivência em grupos de pacientes selecionados e com diminuição da lesão orgânica secundária em modelos animais de choque hemorrágico (Ciesla et al., 2001).

Hipernatremia e acidose hiperclorêmica são potenciais complicações associadas ao uso da ressuscitação com SSH (Matsuoka et al., 1995).

A hipertoncidade atenua várias funções dos neutrófilos incluindo a expressão do CD-11b/CD18 (integrinas), expressão da L-selectina, liberação de elastase, produção de superóxido, fagocitose e transmigração (Angle et al., 2000; Gushchin et al., 2002).

O trauma causa depressão da resposta imunológica principalmente pela inibição das células T reduzindo a produção e liberação da IL-4 e da prostaglandina E2 (PGE2) (Coimbra et al., 1996).

Junger e colaboradores foram os primeiros a demonstrarem a melhora da resposta imunológica pós-trauma com o uso da SSH em infusão rápida. Em seus estudos com camundongos houve redução significativa da mortalidade pós ressuscitação no grupo tratado com SSH. Concentrações plasmáticas de NaCl de 180 mM (370 mOsmol/L) demonstraram melhorar a resposta e a proliferação das células T. Essas concentrações de NaCl são atingidas com a ressuscitação

tradicional de 4 ml/Kg de solução de NaCl a 7,5% infundida em 2 a 5 minutos (Junger et al., 1997).

Angle e cols. demonstraram que a infusão de SSH 7,5%, em doses clinicamente aceitas, aumenta a concentração plasmática de sódio em pelo menos 10 mM e este aumento permanece por pelo menos 1 hora. Esta concentração aumentada é suficiente para afetar a resposta dos neutrófilos *in vitro* (Angle et al., 2000). Estudos clínicos mostram que a osmolaridade plasmática aumenta para aproximadamente 348 mOsm/Kg uma hora após a administração de SSH (Partrick et al., 1998).

A ressuscitação com doses de 4 ml/Kg de SSH a 7,5%, em infusão rápida, resulta no aumento da concentração plasmática de Na⁺ de 150 a 160 mmol/l (Ciesla et al., 2000). Elevações transitórias podem chegar a 180 mmol/l. As mudanças na concentração de Na⁺ podem ser descritas em três fases: 1) um aumento inicial rápido da concentração de Na⁺ com pico na metade da infusão; 2) uma rápida diminuição durante a infusão como resultado da redistribuição do Na⁺ e de água; 3) uma lenta regressão aos níveis normais em 24 horas devido ao clearance do Na⁺. (Ciesla et al., 2001).

Foi demonstrado um efeito dose-dependente da tonicidade sobre a permeabilidade do endotélio microvascular. O aumento nas concentrações de NaCl resulta em progressivo aumento da permeabilidade do endotélio com conseqüente aumento da perda de líquido para o interstício. Esse efeito é atenuado pelo acréscimo de um colóide à solução hipertônica (Dextran 60 ou HeS

200). É possível que este efeito de aumento da permeabilidade seja compensado com efeitos imunomodulatórios sobre os PMN (Victorino et al., 2002).

A possibilidade da SSH aumentar o volume de sangramento e conseqüente mortalidade devido ao rápido aumento da PAM é controversa, permanecendo ainda sem conclusões definitivas na literatura. (Stern et al., 2000).

Levando-se em consideração os aspectos da isquemia, da reperfusão, dos mediadores inflamatórios e da resposta inflamatória sistêmica, a terapia ideal de ressuscitação deveria não apenas restaurar os padrões hemodinâmicos mas também atenuar a exacerbada resposta inflamatória pós-choque (Ciesla et al., 2001).

Os estudos realizados demonstram que a solução salina hipertônica administrada em infusão rápida tem efeitos superiores à solução cristalóide convencional no que concerne à diminuição da acumulação leucocitária, melhora da perfusão sinusoidal hepática e atenuação dos efeitos provocados pelo estresse oxidativo da lesão de isquemia e reperfusão no tratamento do choque hemorrágico. Estes efeitos sugerem que a recuperação da microcirculação e a diminuição dos efeitos deletérios relacionados com a acumulação leucocitária e formação de radicais tóxicos do oxigênio são diretamente dependentes da solução salina hipertônica, e particularmente, da redução do volume das células endoteliais e da sua disfunção. Entretanto, estes efeitos benéficos foram estabelecidos apenas em períodos curtos após a ressuscitação (1 hora), não havendo certeza de sua manutenção ou mesmo ampliação em um período de tempo mais prolongado.

Por esses motivos decidimos avaliar e comparar os parâmetros de integridade, função e estresse oxidativo hepáticos após 6 horas de choque e ressuscitação com solução salina hipertônica em infusão rápida ou com solução cristalóide de Ringer com lactato.

2. OBJETIVOS

Comparar os efeitos tardios (6 horas) da ressuscitação com Solução de Ringer Lactato e com Solução Salina Hipertônica a 7,5% sobre a integridade, função e estresse oxidativo hepáticos após choque hemorrágico controlado em ratos. Especificamente:

- Comparar os parâmetros macro-hemodinâmicos (pressão arterial média, frequência cardíaca) e hematócrito.
- Avaliar a função hepática.
- Verificar a integridade do parênquima hepático
- Determinar o estatus antioxidante do tecido hepático.
- Estimar o grau de estresse oxidativo e da oxidação protéica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Procedimento Cirúrgico

Para o presente estudo foram utilizados ratos machos Wistar com peso entre 225g e 265g, obtidos do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. O estudo foi realizado estritamente de acordo com a legislação vigente para o uso de animais de experimentação e o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (National Institutes of Health, Bethesda, EUA), e após a aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS.

Os animais previamente à cirurgia foram mantidos em jejum de 12 horas, porém com acesso livre a água. A anestesia foi realizada com sulfato de ketamina 75 mg/Kg (Ketamin®, Cristalia, Brasil) e xylazina 10 mg/Kg (Virbaxyl®, Virbax do Brasil, São Paulo, Brasil) via intraperitoneal. Durante as fases de preparação, choque e ressuscitação, foram administradas doses suplementares dos anestésicos (1/3 da dose inicial) sempre que houve sinais de superficialização da anestesia. Utilizaram-se cateteres de polipropileno (PE-50, Portex, Kent, Inglaterra) para canular a artéria carótida direita, a veia jugular direita, a veia femoral direita e a artéria caudal. A artéria carótida serviu para a medida inicial da pressão arterial média (PAM) e a seguir para a remoção do sangue (T0) e

obtenção do choque. Foi mantida uma infusão contínua, pela veia jugular e pela artéria carótida, de solução salina 0,9% à 2 ml/Kg/h para reposição das necessidades basais, compensação das perdas hidro-eletrolíticas e manutenção da perviedade dos catéteres. A veia femoral direita foi utilizada para a reposição volêmica. Pela artéria caudal realizou-se o monitoramento contínuo da PAM durante o experimento.

Após a realização do choque hemorrágico e da ressuscitação, os cateteres da artéria carótida e da veia jugular foram ocluídos e sepultados no tecido subcutâneo da região cervical e do dorso. Os cateteres da artéria caudal e da veia femoral direita foram retirados e os vasos devidamente ligados. As incisões foram suturadas e infiltradas com lidocaína 1% sem vasoconstritor (Cloridrato de Lidocaína 1%, Geyer Medicamentos, Porto Alegre, Brasil). Os animais foram encaminhados para a recuperação em gaiolas apropriadas com aquecimento indireto e livre acesso à água.

Após 6 horas de recuperação os ratos foram novamente anestesiados e realizadas as medidas de PAM, da frequência cardíaca (FC) e determinação do hematócrito (HT). Realizou-se uma laparotomia transversa e cateterização do ducto colédoco para coleta de bile, mantida durante o restante do procedimento e quantificada, ao final, em $\mu\text{l/g}$ de fígado/minuto. O fígado foi liberado de todos os seus ligamentos. Coletaram-se amostras de sangue para as dosagens bioquímicas finais (T6). Ao término dos experimentos os animais foram submetidos à eutanásia com doses letais de tiopental sódico. As amostras de

sangue das medidas basais (T0) e finais foram centrifugadas e o soro posteriormente armazenado em freezer a 80°C negativos.

Os fígados dos animais foram pesados e imediatamente retiradas amostras de tecido para as dosagens bioquímicas (conservadas em nitrogênio líquido e posteriormente em freezer a 80°C negativos) e fragmentos para anátomo-patológico (conservadas em formaldeído a 4%).

3.2 Protocolo Experimental

Após a preparação cirúrgica aguardou-se um período de 10 minutos para a estabilização dos animais e então foram obtidas as medidas basais (PAM e FC), determinado o HT e coletado sangue.

A PAM e a FC foram constantemente monitorizadas e seus valores anotados como basal, choque, 20 minutos, 40 minutos e 6 horas após a ressuscitação (Figura 05). O HT foi mensurado inicialmente (basal), ao final da fase de choque, e após 20 minutos, 40 minutos e 6 horas da ressuscitação (Figura 05).

O choque foi realizado com a remoção de sangue arterial à taxa média de cerca de 0,5 ml/min durante 10 minutos, visando-se obter a PAM de 45 mm Hg, que foi sustentada durante 60 minutos. Para manter a PAM constante durante a fase de choque, quantidades adicionais de sangue foram retiradas ou reinfundidas, conforme necessário.

As amostras de sangue na indução do choque (T0) foram imediatamente centrifugadas e o soro congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer a 80°C negativos.

Ao final da fase de choque os animais foram randomizados e divididos em dois grupos:

- 01. Grupo RL (n=8): recebeu solução de Ringer Lactato (RL) na dose de 4 vezes o volume sangüíneo retirado, em infusão EV constante, por um período de 20 minutos.
- 02. Grupo SSH (n=8): recebeu Solução Salina Hipertônica (SSH) à 7,5% na dose de 10% do volume sangüíneo removido, em infusão EV constante, em 2 minutos.

Após o período de ressuscitação inicial (20 minutos) os animais receberam, por mais 20 minutos, infusão de solução salina 0,9% na dose de 20 ml/Kg/h para continuidade da ressuscitação.

Um grupo adicional de 3 animais serviu de controle. Estes animais foram anestesiados e submetidos à preparação cirúrgica, porém não foram submetidos ao choque e ressuscitação. Destes animais também foram coletadas amostras de sangue, de tecido hepático, os fígados foram pesados e o fluxo biliar quantificado.

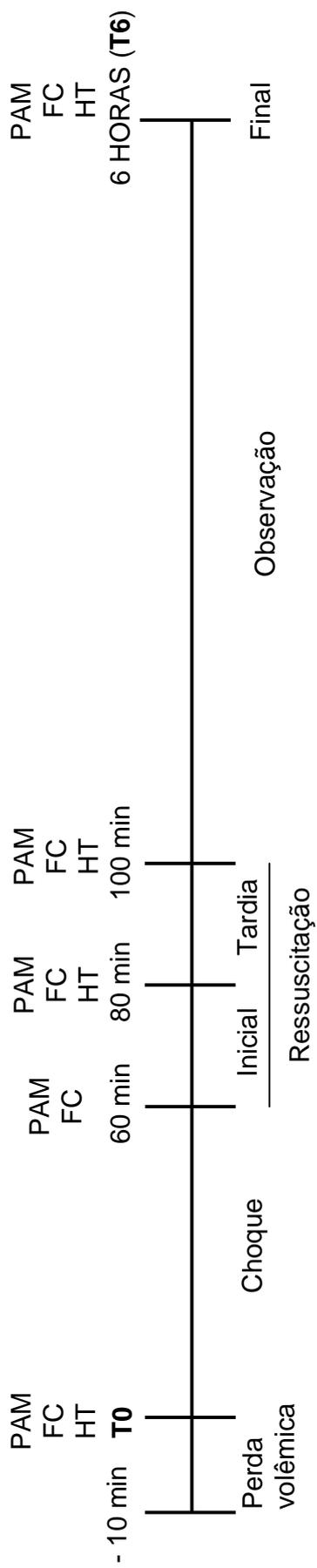


Figura 05. Delineamento gráfico do protocolo experimental (PAM: Pressão Arterial Média; FC: Frequência Cardíaca; HT: Hematócrito)

3.3 Dosagens Laboratoriais

3.3.1 – Determinação da Alanino Aminotransferase (ALT) e Bilirrubinas

A integridade do parênquima hepático foi avaliada pela quantificação de ALT e das bilirrubinas plasmáticas. As dosagens plasmáticas de ALT e das bilirrubinas foram obtidas em laboratório de análises clínicas, utilizando-se kits standard LABTEST® (Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.3.2 - Atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT):

A atividade das enzimas antioxidantes foi aferida no tecido hepático dos animais. O extrato de tecido foi lavado com solução salina e homogeneizado em solução de tampão fosfato (pH 7,4). A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente pela inibição da auto-oxidação em uma solução tampão contendo 1mM de adrenalina/50 mM glicina-NaOH (pH10,2). A descrição detalhada do método foi publicada por Klamt e cols (Klamt et al., 2001).

Para determinar a atividade da CAT os tecidos foram sonicados em solução tampão fosfato 50 mM (pH 7,0). A suspensão resultante foi centrifugada a 3000 xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade da CAT pela medida da taxa de decréscimo da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm, conforme método previamente descrito (Dal Pizzol et al., 2001).

3.3.3 –Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase, como índice de infiltração neutrofílica, foi determinada no tecido hepático, que foi homogeneizado em solução de HTAB (hexa-decil-trimetyl-amônio-brometo) a 4°C. A seguir, foi centrifugado e coletado o sobrenadante para as dosagens. A absorbância foi lida em 650 nm. O método encontra-se detalhadamente descrito por Kyriakides e cols. (Kyriakides et al., 2000)

3.3.4 - Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):

Como índice de peroxidação lipídica determinou-se a concentração de TBARS plasmático. As amostras obtidas foram homogeneizadas em 1ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico 0,67%. Foram então aquecidas a 100°C por 15 minutos e adicionou-se butanol (2:1) à solução. A mistura foi centrifugada a 800 xg durante 5 minutos. A quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm. Para maiores detalhes do método pode-se consultar Dal Pizzol e cols (2000) (Dal Pizzol et al., 2000).

3.3.5 - Medida do dano oxidativo em proteínas:

O dano oxidativo em proteínas plasmáticas foi determinado pela dosagem dos grupos carbonil de acordo com o método de Levine (Klamt et al., 2001). As proteínas das amostras obtidas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 20%, a 4°C, durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 4000 xg por 5 minutos. As proteínas foram redissolvidas com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) 10 mM. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. As proteínas foram novamente precipitadas com TCA e lavadas três vezes com etanol etil acetato para remover o excesso de DNPH. Finalmente, as amostras foram novamente dissolvidas (KH₂PO₄ 20mM (pH 2,3)) e a absorbância lida em 370nm, conforme descrito previamente por Klamt e cols (Klamt et al., 2001).

3.4 Análise Histopatológica

O escore de lesão histopatológica quantificou a integridade do tecido hepático. Secções do tecido hepático foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). A avaliação foi feita em microscópio óptico com magnificação de 400 aumentos. Para a quantificação das lesões utilizou-se uma adaptação das escalas publicadas por Suzuki (Markin et al., 1993; Suzuki et al., 1993), atribuindo-se um valor de zero a quatro para as alterações morfológicas observadas em relação à congestão sinusoidal, degeneração hidrópica (vacuolização), necrose celular e infiltração neutrofílica conforme detalhado na tabela 02. A análise foi realizada por patologista experiente sem conhecimento do grupo a que cada amostra pertencia.

Foram examinados 10 campos por corte histológico de tecido hepático, sendo que cada campo incluía pelo menos uma veia centrolobular e um espaço porta, de acordo com o proposto por Rensing e cols (Rensing et al., 1999). Os escores finais foram determinados pela soma dos escores de cada parâmetro. A escala de quantificação da lesão histopatológica é apresentada na tabela 02.

	Congestão sinusoidal	Degeneração hidrópica	Necrose Celular	Infiltrado neutrófilico
0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1	Dilatação de veia centrilobular	Mínima	Necrose focal de células isoladas	Mínimo
2	Dilatação de veia centrilobular e de sinusóides em algumas zonas 3	Leve	Necrose confluyente envolvendo hepatócitos adjacentes (< 30%)	Leve
3	Dilatação de veia centrilobular e de sinusóides na maioria das zonas 3.	Moderada	Necrose zonal envolvendo hepatócitos adjacentes. (30 a 60%)	Moderado
4	Dilatação de veia centrilobular e de sinusóides em zonas 2 e 3.	Grave	Necrose generalizada	Grave

Tabela 02. Escore de quantificação da lesão histopatológica
(adaptado de Suzuki e colaboradores, 1993)

3.5 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (\pm EP).

Os dados foram analisados e comparados pelo software Sigma Stat 3.0 e os gráficos realizados utilizando-se o software Sigma Plot 8.0. Dentro dos grupos os dados basais (T0) e os resultados finais (T6) foram comparados pelo teste de Wilcoxon. Entre os grupos foram comparados os resultados através do teste “U” de Mann-Whitney.

Para as comparações de variações múltiplas entre os grupos de tratamento e o grupo controle utilizou-se a análise da variância não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis com teste “post-hoc” de Dunn. Também foi utilizado o teste de ANOVA para Medidas Repetidas com teste de comparação múltipla de Tukey para comparação dos diversos períodos dentro dos grupos. Considerou-se significativo um $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Peso dos Animais

No início dos experimentos não houve diferença entre o peso basal dos animais. No grupo RL o peso médio foi de $248,7 \pm 4,4$ g passando, ao final, para $260,8 \pm 4,8$ g ($p < 0,001$). No grupo SSH o peso variou de uma média de $246,5 \pm 3,11$ g para $240,1 \pm 2,4$ g ($p < 0,05$). Ao final dos experimentos houve significativa redução da média do peso no grupo SSH em relação ao grupo RL ($p < 0,05$) conforme apresentado na tabela 03.

	Peso basal (g)	Peso 6H (g)
Grupo RL	$248,8 \pm 4,4$	$260,9 \pm 4,8^{\#}$
Grupo SSH	$246,5 \pm 3,11$	$240,1 \pm 2,4^{* \S}$

Tabela 03. Médias dos pesos dos animais. * $p < 0,05$ vs RL-6H - Teste U de Mann-Whitney. # $p < 0,001$ vs RL basal; § $p < 0,05$ vs SSH basal - Teste de Wilcoxon. Dados: média \pm EP

4.2 Pressão Arterial Média, Frequência Cardíaca e Hematócrito

Para manter a PAM em 45 mmHg durante o período de 60 minutos foi retirado dos animais um volume sanguíneo médio de $6,53 \pm 0,11$ ml. Os níveis iniciais de PAM, FC e HT não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Os resultados de PAM, FC e HT dos experimentos estão apresentados na Tabela 04.

Os níveis pressóricos basais foram de $109 \pm 3,6$ mm Hg para o grupo RL e de $111,3 \pm 3,7$ mm Hg no grupo SSH. Durante a fase de choque houve queda significativa da PAM nos dois grupos de tratamento quando comparados com as medidas basais ($p < 0,05$), mas sem diferença entre os grupos. Apesar da elevação da PAM promovida por ambas as terapias, aos 20 e 40 minutos persistiu uma diminuição significativa em relação às medidas basais ($p < 0,05$). Após 6 horas da ressuscitação as médias da PAM (T6) foram de $72,5 \pm 4$ mm Hg, para o grupo RL, e de $67,5 \pm 2$ mm Hg, para o grupo SSH. As médias finais apresentaram queda significativa em relação às medidas basais ($p < 0,001$), porém, sem diferença entre os grupos.

As medidas basais de FC nos grupos RL e SSH foram, respectivamente, $211 \pm 5,8$ bpm e $230 \pm 12,9$ bpm. O choque causou diminuição da FC nos dois grupos tratamento, todavia sem diferença significativa entre eles. Após 20 minutos e 40 minutos da ressuscitação observou-se a recuperação da FC de forma similar nos grupos sem diferença estatística entre eles. Ao final dos experimentos houve

retorno da FC aos valores iniciais em ambos os grupos (RL $217 \pm 9,6$ bpm e SSH $217 \pm 8,8$ bpm).

Os níveis basais do HT nos grupos RL e SSH foram $44,5 \pm 1,2$ % e $42 \pm 0,8$ %, respectivamente. O choque provocou queda significativa do hematócrito nos grupos em comparação com as medidas basais ($p < 0,05$). O tratamento do choque promoveu queda mais acentuada do HT dos grupos aos 20 minutos e aos 40 minutos ($p < 0,05$ vs basal). Ao final dos experimentos os animais permaneceram com significativa diminuição do HT em comparação com as medidas basais ($p < 0,05$) mas sem diferença significativa entre eles. Os valores finais do HT foram de $24,3 \pm 1,1$ %, no grupo RL, e de $25,8 \pm 1,3$ %, para o grupo SSH.

Grupo	Basal	Choque	20 Min Ressuscitação	40 Min Ressuscitação	6 Horas Ressuscitação
PAM (mmHg)					
RL	109 ± 3,6	46,38 ± 1,7*	90,2 ± 6,2*	76,3 ± 3,4*	72,5 ± 4*
SSH	111,3 ± 3,7	47,75 ± 2,7*	83 ± 3,4*	74,1 ± 2,6*	67,5 ± 2*
FC (bpm)					
RL	211 ± 5,8	152 ± 14,6*	181 ± 5,6	196 ± 8	217 ± 9,6
SSH	230 ± 12,9	170 ± 11*	174 ± 7	202 ± 7	217 ± 8,8
HT (%)					
RL	44,5 ± 1,2	33,7 ± 1,2*	25,8 ± 1,2*#	25,2 ± 1,1*#	24,3 ± 1,1*#
SSH	42 ± 0,8	32,3 ± 1,3*	27 ± 0,8*#	26,6 ± 0,8*#	25,8 ± 1,3*#

Tabela 04. Variação dos níveis de Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC) e Hematócrito (HT) dos experimentos. * p<0,05 vs basal. # p<0,05 vs choque. ANOVA para Medidas Repetidas com teste de comparação múltipla de Tukey. Os dados são apresentados como médias ± EP.

4.3 Peso dos Fígados e Fluxo Biliar

As médias de peso dos fígados dos animais foi de $8,34 \pm 0,36$ g (grupo RL) e de $8,52 \pm 0,14$ g (grupo SSH) não havendo diferença significativa entre eles.

Após uma hora de choque e de seu tratamento o fluxo biliar no grupo RL foi de $0,34 \pm 0,02 \mu\text{l.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, de $0,48 \pm 0,03 \mu\text{l.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ no grupo SSH e de $0,64 \pm 0,04 \mu\text{l.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ no grupo controle. Quando comparados os três grupos pela análise de variância, o fluxo biliar foi significativamente maior no grupo SSH ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo RL porém, sem diferença estatística para o grupo controle, o que não ocorreu com o grupo RL ($p < 0,05$ vs controle). Figura 06.

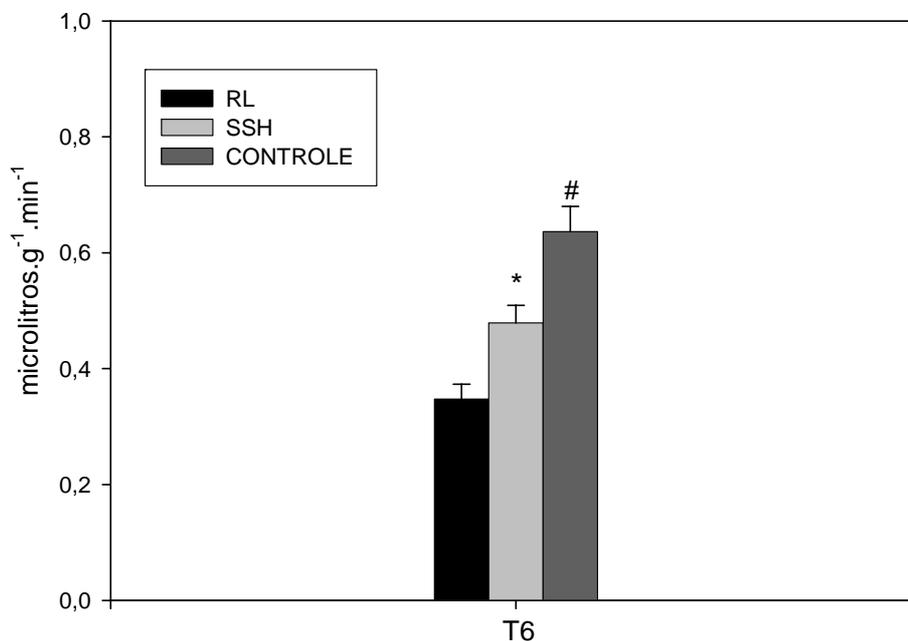


Figura 06. Variação do fluxo biliar entre os grupos RL (n=8), SSH (n=8) e controle (n=3). * p<0,05 vs RL. # p<0,001 vs RL. Análise de variância de Kruskal-Wallis com comparação múltipla pelo teste de Dunn. Os dados são apresentados como médias ± EP.

4.4 ALT e BILIRRUBINAS

No grupo RL a ALT sérica aumentou de $37,1 \pm 2,2$ U/l (T0) para $169,6 \pm 3,9$ U/l (T6) (p<0,001). No grupo SSH a ALT aumentou de $39,1 \pm 2,2$ U/l (T0) para $99,4 \pm 2,1$ U/l (T6) (p<0,001). Em comparação com o grupo RL, os animais do grupo SSH apresentaram níveis significativamente menores de ALT (p<0,001). Figura 07.

As bilirrubinas séricas do grupo RL foram quantificadas em $0,23 \pm 0,01$ mg/dl (T0) e $1,68 \pm 0,05$ mg/dl (T6) ($p < 0,001$). No grupo SSH as medidas foram $0,22 \pm 0,01$ mg/dl (T0) e $0,62 \pm 0,03$ mg/dl (T6) ($p < 0,001$). Após 6 horas da ressuscitação o grupo SSH apresentou níveis significativamente mais baixos de bilirrubinas quando comparado com o grupo RL ($p < 0,001$) – Figura 08.

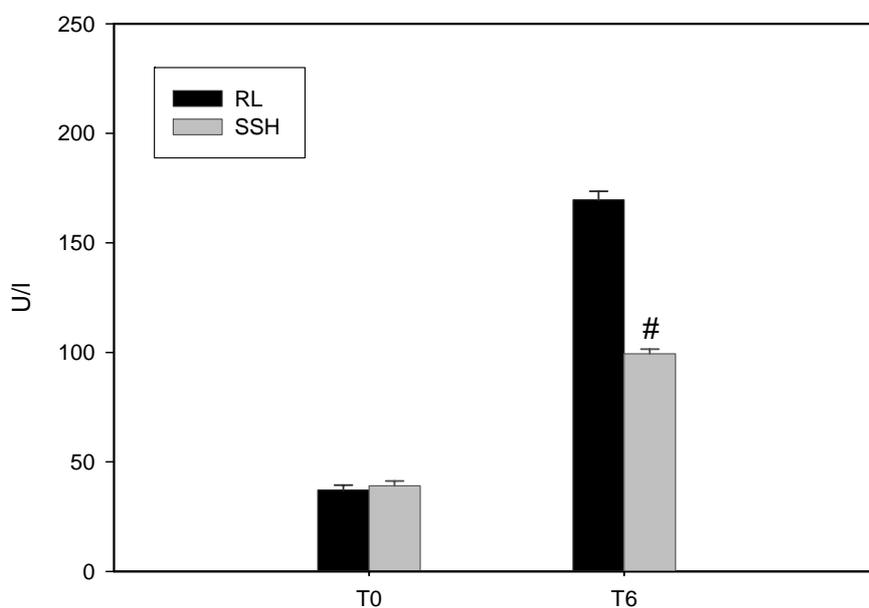


Figura 07. Variação do níveis de Alanino Aminotransferase sérica, basais (T0) e após 6 horas (T6) de ressuscitação, nos grupos RL (n=8) e SSH (n=8). # $p < 0,001$ Teste U de Mann-Whitney. Os dados são apresentados como médias \pm EP.

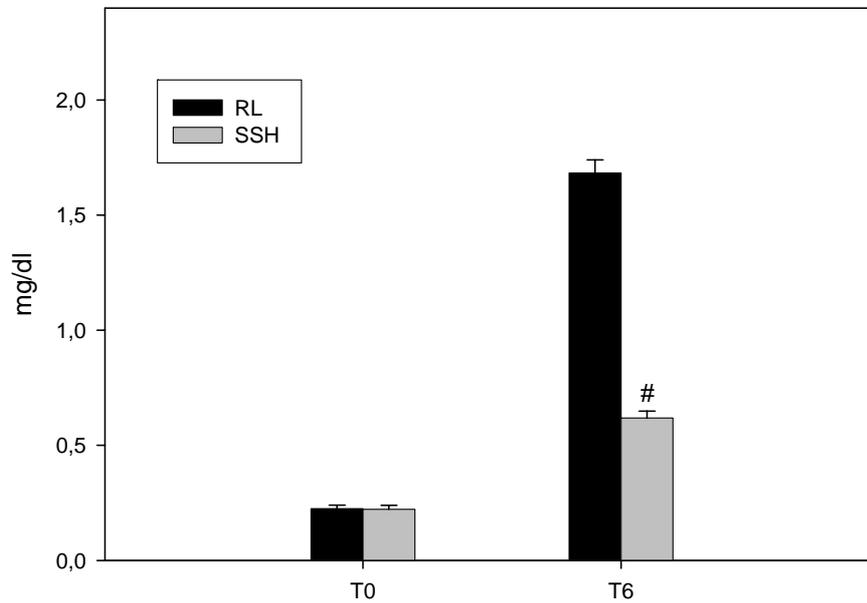


Figura 08. Variação nos níveis de bilirrubinas séricas nos tempos basais (T0) e ao final do experimento (T6). # $p < 0,001$ vs RL-T6. Teste U de Mann-Whitney. Os dados são apresentados como médias \pm EP.

4.5 Catalase e Superóxido Dismutase

Os níveis de CAT mensurados nos grupos foram de $21,8 \pm 0,48$ U/mg de proteína no grupo RL, de $20,3 \pm 2,7$ U/mg de proteína no grupo SSH e de $20,1 \pm 0,84$ U/mg de proteína no grupo controle. A análise de variância não mostrou diferença significativa entre os grupos. Figura 09.

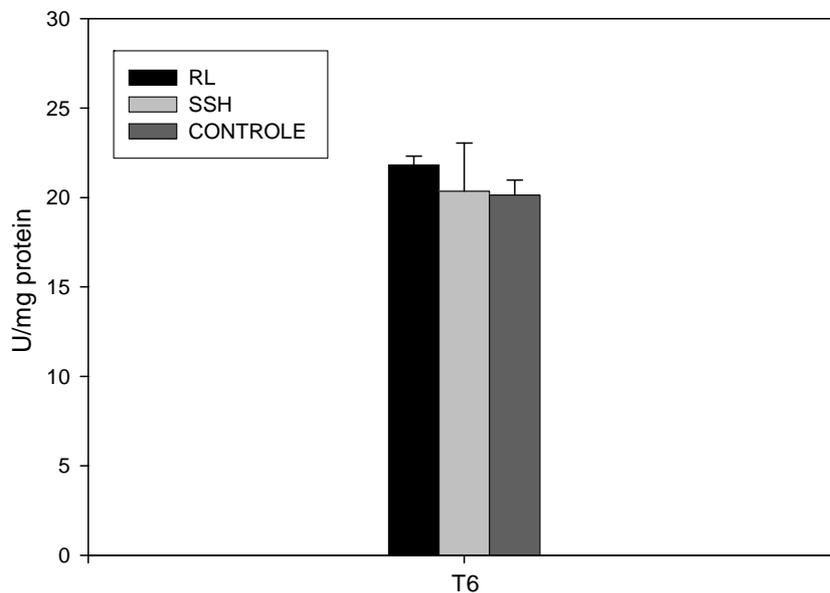


Figura 09. variação na atividade da catalase nos grupos RL (n=8), SSH (n=8) e controle (n=3). Análise de variância de Kruskal-Wallis. Os dados são apresentados como médias \pm EP.

A determinação dos níveis de SOD mostrou como resultados $6,45 \pm 0,24$ U/mg de proteína (grupo RL), $5,98 \pm 0,36$ U/mg de proteína (grupo SSH) e $6 \pm 0,46$ U/mg de proteína (grupo controle). Na comparação da variação entre os grupos não houve diferença significativa entre eles. Figura 10.

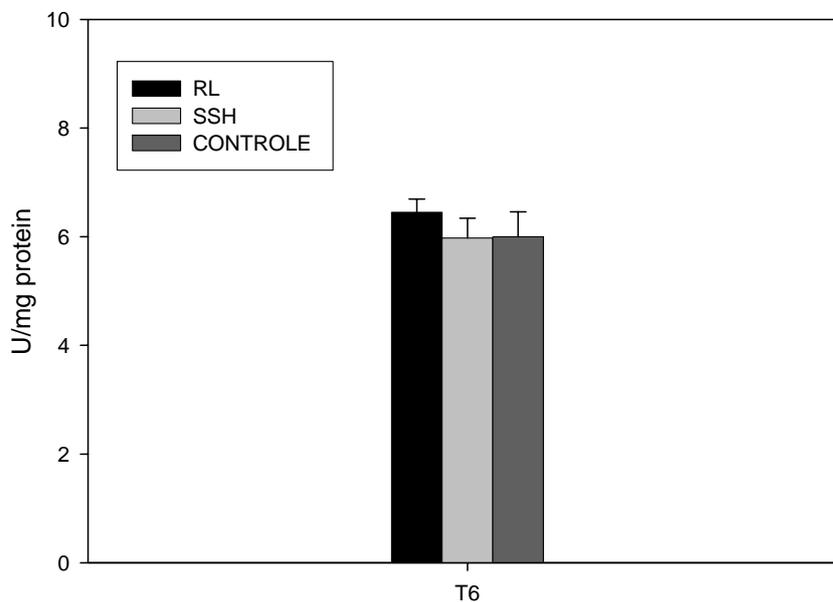


Figura 10. Variação na atividade da superóxido dismutase entre os grupos RL (n=8), SSH (n=8) e controle (n=3). Análise de variância de Kruskal-Wallis. Os dados são apresentados como médias \pm EP.

4.6 Mieloperoxidase

A determinação da MPO ao final dos experimentos apresentou níveis de $32,8 \pm 1,07$ unidades/g de tecido para o grupo RL. O grupo SSH apresentou como resultado $21,6 \pm 0,74$ unidades/g de tecido e o grupo controle $13,8 \pm 0,82$ unidades/g de tecido.

Quando comparamos a variação na atividade da MPO nos grupos, verificamos que o choque e ressuscitação com RL provocaram aumento

significativo ($p < 0,05$) nos níveis de MPO em relação ao grupo controle. O grupo tratado com SSH apresentou atenuação da atividade da MPO em relação ao grupo RL ($p < 0,05$), não apresentando diferença para o grupo controle. Figura 11.

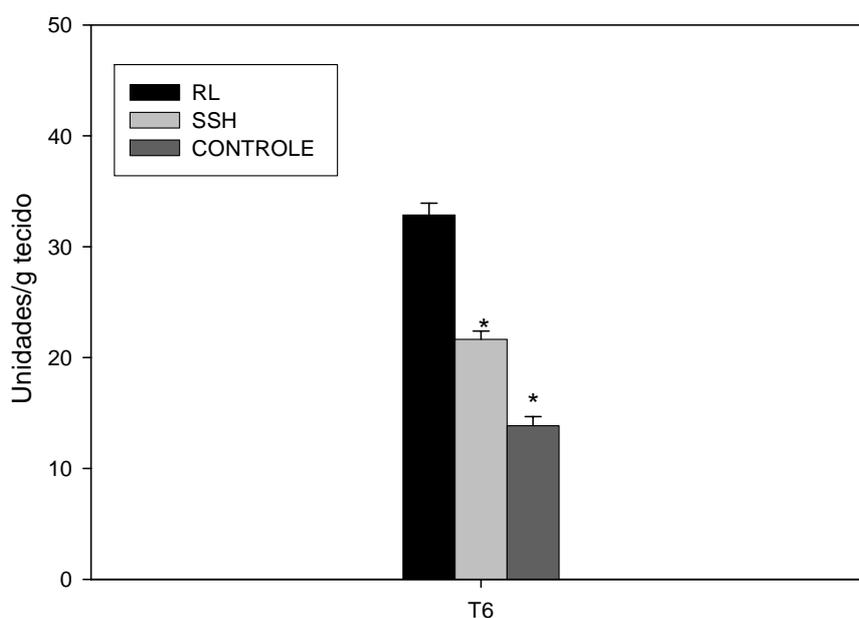


Figura 11. Variação na atividade de mieloperoxidase nos grupos RL (n=8), SSH (n=8) e controle (n=3). * $p < 0,05$ vs RL. Análise de variância de Kruskal-Wallis com comparação múltipla pelo teste de Dunn. Os dados são apresentados como médias \pm EP.

4.7 Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico - TBARS

As medidas de TBARS no grupo RL foram de $0,91 \pm 0,03$ nm/mg passando para $3,26 \pm 0,11$ nm/mg ($p < 0,001$). No grupo SSH foram de $0,98 \pm 0,02$ nm/mg e $1,67 \pm 0,08$ nm/mg ($p < 0,001$).

Houve redução significativa da peroxidação lipídica no grupo tratado com SSH em relação ao grupo RL ($p < 0,001$). Figura 12.

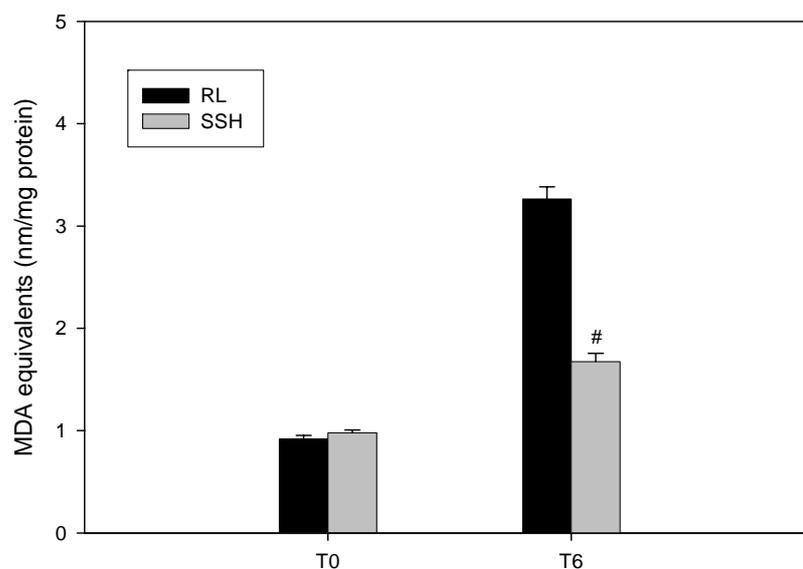


Figura 12. Níveis basais e após 6 horas de ressuscitação das Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico – TBARS – sérico nos grupos RL (n=8) e SSH (n=8). # $p < 0,001$ vs RL. Teste U de Mann-Whitney. Os dados são apresentados como médias \pm EP.

4.8 Proteína Carbonilada

O dano oxidativo nas proteínas plasmáticas, quantificado pela determinação da proteína carbonilada, apresentou como resultados no grupo RL variação de $0,11 \pm 0,01$ nm/mg (T0) para $1,63 \pm 0,07$ nm/mg (T6) – $p < 0,001$. No grupo SSH as medidas da proteína carbonilada foram de $0,14 \pm 0,01$ nm/mg (T0) e de $0,56 \pm 0,02$ nm/mg (T6) – $p < 0,001$.

Em ambos os grupos ocorreram danos oxidativos às proteínas plasmáticas, porém, de maneira significativamente atenuada no grupo SSH quando comparado ao grupo RL ($p < 0,001$). Figura 13.

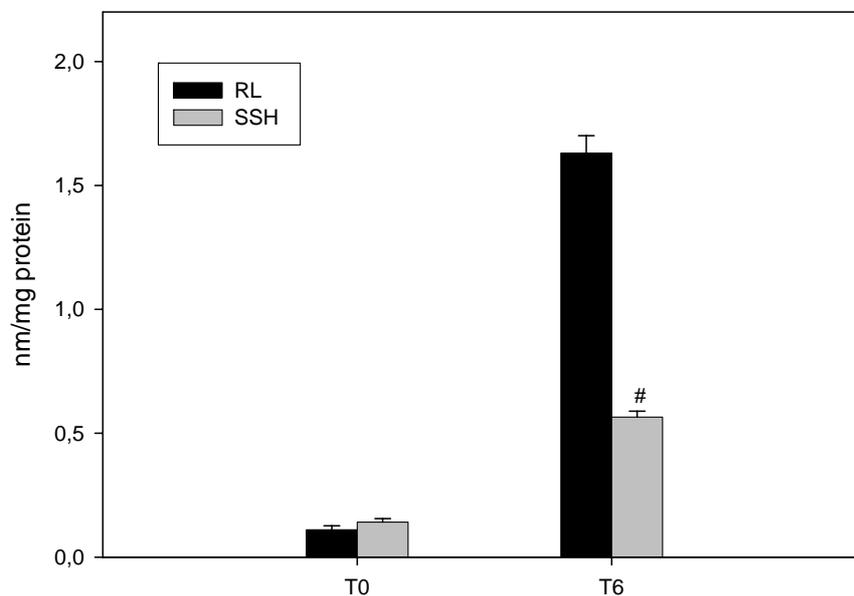


Figura 13. Quantificação do dano oxidativo às proteínas plasmáticas – proteína carbonilada – nos grupo RL (n=8) e SSH (n=8). # $p < 0,001$ vs RL-T6. Teste U de Mann-Whitney. Os dados são apresentados como médias \pm EP.

4.9 Análise Histopatológica

Os escores de lesão histopatológica são apresentados na tabela a seguir.

GRUPO RL	CONGESTÃO	DEGENERAÇÃO	NECROSE	INFILTRAÇÃO	ESCORE
	SINUSOIDAL	HIDRÓPICA	CELULAR	NEUTROFÍLICA	
02	2	1	2	3	8
04	2	2	2	2	8
07	3	1	3	3	10
08	3	0	3	3	9
11	2	0	2	3	7
13	4	2	2	3	11
14	3	0	2	3	8
16	3	0	4	4	11
	$2,75 \pm 0,25^{\S}$	$0,75 \pm 0,31$	$2,5 \pm 0,27^{\S}$	$3 \pm 0,53^{\S}$	$9 \pm 0,53^{\S}$
GRUPO SSH					
01	1	1	1	1	4
03	1	3	1	2	7
05	2	0	3	2	7
06	1	0	3	2	6
09	1	0	1	1	3
10	2	0	1	2	5
12	1	1	2	2	6
15	2	1	2	2	7
	$1,37 \pm 0,18^*$	$0,75 \pm 0,36$	$1,75 \pm 0,31$	$1,75 \pm 0,16^*$	$5,62 \pm 0,53^{\S^*}$
CONTROLE					
C1	0	0	1	0	1
C2	0	0	0	1	1
C3	1	0	0	1	2
	$0,33 \pm 0,33$	0	$0,33 \pm 0,33$	$0,67 \pm 0,33$	$1,33 \pm 0,33$

Tabela 05. Resultados dos Escores de Lesão Histopatológica nos grupos RL (n=8), SSH (n=8) e controle (n=3). * $p < 0,05$ vs RL. § $p < 0,05$ vs controle. Análise de variância de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn. Os dados são apresentados em médias \pm EP.

O choque hemorrágico e seu tratamento determinaram graus variados de congestão sinusoidal, degeneração hidrópica, necrose celular e infiltração neutrofílica. Individualmente, não foi encontrada diferença significativa nos graus de degeneração hidrópica e de necrose celular entre os grupo RL e SSH. Todavia, houve diferença significativa entre o escore de necrose celular do grupo RL e do grupo controle ($p < 0,05$). Os escores referentes à congestão sinusoidal ($2,75 \pm 0,25$ – RL, $1,37 \pm 0,18$ – SSH e $0,33 \pm 0,33$ – controle) e à infiltração neutrofílica ($3 \pm 0,53$ – RL, $1,75 \pm 0,16$ – SSH e $0,67 \pm 0,33$ – controle) do grupo RL mostraram diferença significativa para o grupo SSH e para o grupo controle ($p < 0,05$) – tabela 05. As médias dos escores finais de lesão histopatológica foram de $5,62 \pm 0,53$, para o grupo RL, de $9 \pm 0,53$, para o grupo SSH e de $1,33 \pm 0,33$ no grupo controle ($p < 0,05$ RL vs controle, RL vs SSH e SSH vs controle). Figura 14.

As lesões histopatológicas mais freqüentes estão apresentadas a seguir:

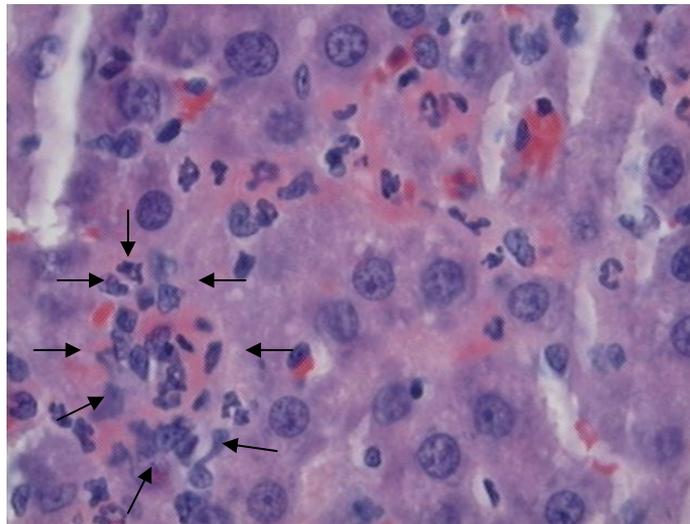


Figura 14. . Área de necrose hepática margeada por infiltrado polimorfonuclear (setas finas). H.E. com magnificação de 400 vezes.

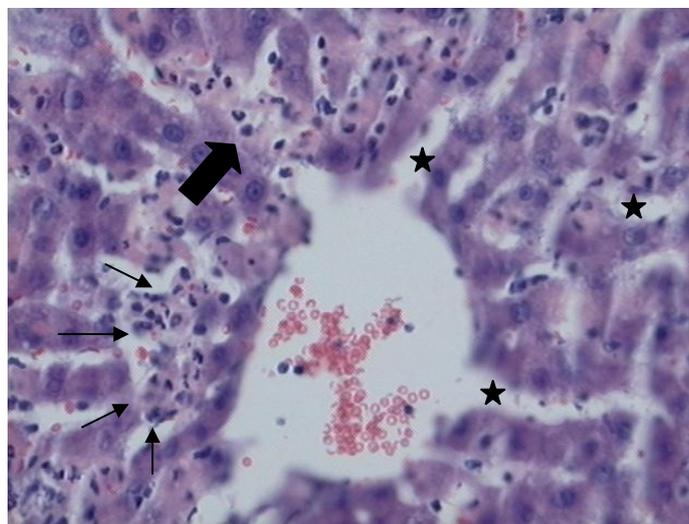


Figura 15. Veia pós-sinusoidal com áreas de necrose (setas estreitas), infiltrado polimorfonuclear (seta larga) e dilatação sinusoidal (estrela cheia). H.E. com magnificação de 200 vezes.

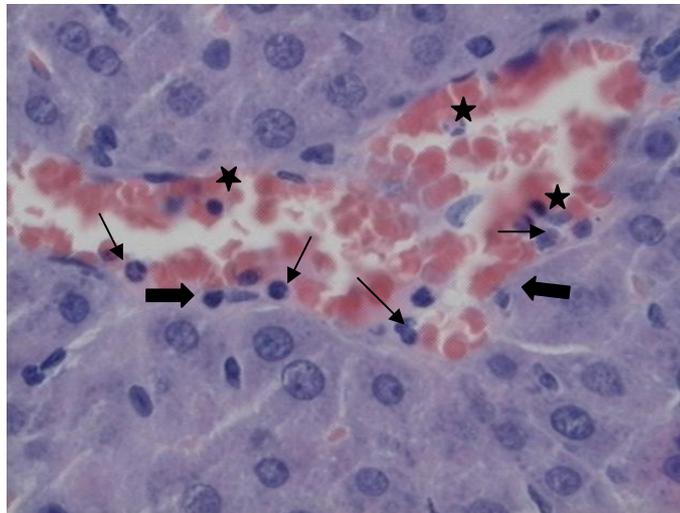


Figura 16. Veia pós-sinusoidal com leucócitos na luz vascular (estrela), aderidos ao endotélio (setas finas) e infiltrados no interstício (setas largas). H.E. com magnificação de 400 vezes.

5. DISCUSSÃO

Nosso modelo de choque hemorrágico envolveu a avaliação do estresse oxidativo e dano tecidual hepático causado pela lesão de I/R após o uso de solução de Ringer com Lactato e de Solução Salina Hipertônica a 7,5%. A avaliação destes parâmetros foi realizada após 6 horas da ressuscitação, por este período representar um momento adequado da avaliação da resposta inflamatória inicial na lesão de I/R, que se segue ao choque hemorrágico traumático e seu tratamento. (Yamakawa et al., 2000)

Muitos fatores são responsáveis pela alta susceptibilidade de falência de perfusão da microcirculação durante o choque hemorrágico, entre eles. (Corso et al., 1998)

- redução da pressão de perfusão capilar com redução do volume sangüíneo;
- edema das células endoteliais, induzido pela hipóxia, reduzindo o lúmen capilar;
- hemoconcentração, levando a aumento da viscosidade sangüínea;
- quebra da barreira endotelial celular com aumento final da pressão intersticial;
- comprometimento do lúmen sinusoidal entre as células de Kupffer e ativação dos leucócitos;
- liberação de mediadores vasoconstritores pelo sistema nervoso simpático;
- disfunção das células do endotélio sinusoidal.

Longos períodos de hipoperfusão hepática resultam em deterioração estrutural, disfunção metabólica e desarranjos microcirculatórios detectáveis precocemente após 2 horas de isquemia. Nesta fase estes fenômenos parecem ser reversíveis. As lesões ocorrem principalmente nas regiões centrolobulares (veias pós-sinusoidais) e após três horas de isquemia progridem para todo o parênquima hepático, tornando-se completamente irreversíveis. Isto faz com que o tempo para o início e a duração da reperfusão sejam determinantes na geração de lesão (Adkison et al., 1986).

A reintrodução do oxigênio molecular durante o período de ressuscitação é mais importante gerador de lesão do que sua privação pela isquemia, levando a peroxidação lipídica das membranas celulares. Os RLO ativam os leucócitos e aumentam a expressão das moléculas de adesão tanto no endotélio capilar como nos leucócitos. A microcirculação é o primeiro e mais intenso alvo da lesão de reperfusão pós-isquêmica (Adkison et al., 1986; Corso et al., 1998).

A ativação e adesão dos neutrófilos ao endotélio é o evento crítico inicial da patogênese da lesão microvascular induzida pela I/R. Nesse processo participam ativamente as moléculas de adesão, principalmente as selectinas, a ICAM-1 e as beta-2-integrinas (Martinez-Mier et al., 2000; Menger et al., 1992a).

O acúmulo de leucócitos no fígado deve-se a características próprias da arquitetura dos sinusóides, caracterizados por: diâmetro estreito (peri-portal), trajeto tortuoso e endotélio fenestrado. A tortuosidade dos sinusóides nos segmentos proximais, a distribuição lobular das células de Kupffer e a junção contrátil das células na transição terminal das veias portais para os sinusóides

contribuem para a pronunciada interação leucócito-endotélio nas zonas média e periportais quando comparadas com a área pericentral (Vollmar et al., 1996).

Devido às características de fenestração do seu endotélio, as vênulas pós-sinusoidais são os locais quase exclusivos de adesão e migração leucocitária. O endotélio destes vasos é rico em selectinas (E e P) (McEver, 1992).

Em um estudo em um modelo de isquemia e reperfusão, onde o acúmulo de neutrófilos foi bloqueado, verificou-se proteção da lesão hepatocelular demonstrando a participação efetiva destas células no mecanismo de lesão (Yamakawa et al., 2000).

As células de Kupffer exercem papel fundamental na patogênese da lesão hepática de I/R. Modelos em ratos mostram ativação precoce destas células durante o período de reperfusão com aumento da liberação de citosinas inflamatórias e de RLO (Koustova et al., 2002; Serracino-Inglott et al., 2001). Os RLO participam, através da sua geração no ciclo catalizado pela xantina oxidase, diretamente da peroxidação das membranas plasmáticas celulares (Adkison et al., 1986). A presença aumentada de RLO no tecido hepático pode ativar fatores genéticos de transcrição sensíveis ao estresse oxidativo, induzindo a ativação de genes pró-inflamatórios, conseqüentemente aumentando o dano celular hepático. Além disso, os RLO podem contribuir para a ativação de proteases cálcio-dependentes (calpaínas), as quais são potentes mediadores intracelulares dos processos de necrose e apoptose celular (Schauer et al., 2004).

O uso de fluidos intravenosos para o tratamento inicial de pacientes politraumatizados em choque hipovolêmico é o ponto inicial no manejo proposto

por diversos protocolos de atendimento inicial ao traumatizado. Entre estes protocolos inclui-se o ATLS (Suporte Avançado de Vida no Trauma), o qual tem sido amplamente aceito e utilizado nos Estados Unidos e na América Latina. O ATLS preconiza a reposição agressiva com grandes volumes de solução cristalóide, de preferência o Ringer Lactato, para a terapia dos pacientes em choque hipovolêmico. O volume de cristalóide a ser repostado na ressuscitação inicial é de 3 a 4 ml de Ringer Lactato para cada mililitro de sangue perdido. (ATLS - American College of Surgeons, 1997) Estudos prévios demonstraram que a ressuscitação com Ringer Lactato (3 vezes o volume perdido) restaura o débito cardíaco e a função hepatocelular imediatamente após a ressuscitação. (Deb et al., 1999; Shah et al., 2002; Wang and Chaudry, 1991) Porém, têm-se evidências de que a reposição de grandes volumes de cristalóide não tem nenhum efeito benéfico sobre a interação leucócito-endotélio e não restaura adequadamente a perfusão microcirculatória. (Koustova et al., 2002; Messmer K et al., 1996) Em um estudo *in vitro*, Wang e colaboradores observaram que a disfunção celular endotelial persistiu após a ressuscitação com RL. (Wang et al., 1993) Resultados recentes demonstram que a ressuscitação com grandes volumes de cristalóide pode exacerbar a reação pró-inflamatória após hemorragia, além de provocar marcante hemodiluição mesmo após cessado o sangramento (Gushchin et al., 2002; Liu et al., 2003).

Em 1980 renasceu o interesse sobre a ressuscitação com soluções hipertônicas, tendo sido publicados estudos significativos demonstrando a rápida recuperação dos parâmetros macro-hemodinâmicos em cães submetidos a

choque hemorrágico (Velasco et al., 1980) e em pacientes com hipotensão refratária pós-trauma (de, Jr. et al., 1980).

Diversos autores publicaram resultados a partir do trabalho de Rocha e Silva (Rocha-e-Silva et al., 1986) demonstrando melhora da perfusão microcirculatória em diversos órgãos após a ressuscitação com SSH. (Messmer K et al., 1996; Nakayama et al., 1984b; Wade et al., 2003)

Atualmente encontra-se demonstrado por muitos pesquisadores que, pequenos volumes de SSH podem ser superiores à ressuscitação com cristalóides, limitando a resposta inflamatória e prevenindo a lesão microcirculatória pós-isquêmica. Estes efeitos repercutem na melhora do fluxo sanguíneo hepático, intestinal e pulmonar. (Maningas, 1987; Shi et al., 2002; Traverso et al., 1987; Wade et al., 1989)

A SSH demonstrou causar profundas alterações na diminuição da expressão das selectinas e das integrinas na superfície dos neutrófilos, tornando os neutrófilos circulantes impróprios para a adesão. (Rotstein, 2000) A SSH reduz as interações leucócito-endotélio, reduz a reação pró-inflamatória, modula a resposta citotóxica dos neutrófilos e aparentemente diminui a apoptose hepática e intestinal. (Gonzalez et al., 2002; Murao et al., 2003a; Shields et al., 2003) Por estes motivos, esta solução tem sido considerada por muitos autores como a nova forma da abordagem para o controle da ativação neutrofílica após o choque hemorrágico traumático. (Murao et al., 2003b)

A rápida e sustentada melhora hemodinâmica provocada pelo uso da SSH é atribuída à alta concentração de sódio e da resultante hiperosmolaridade

plasmática. Além disso, de acordo com resultados recentes publicados por Gurfinkel e colaboradores, animais em choque hemorrágico tratados com SSH apresentaram níveis plasmáticos menores de TNF-alfa, IL-6 e lactato, e ainda, melhora das taxas de sobrevivência, quando comparados à ressuscitação com fluidos isotônicos. (Gurfinkel et al., 2003)

A dose apropriada para infusão de SSH no choque hipovolêmico deve ser de 4 ml/Kg administrada em infusão rápida, dentro de 2 a 5 minutos. Acima deste tempo de infusão os efeitos da recuperação hemodinâmica não são mais percebidos. (Dubick et al., 1995)

Em nosso estudo, os animais tratados com RL apresentaram rápida e significativa melhora da PAM e da FC verificada aos 20 minutos da ressuscitação quando comparados aos valores basais. Porém, após 40 minutos da ressuscitação, esse efeito não é mais observado, havendo queda da PAM e não apresentando diferença significativa para o grupo SSH. Os níveis pressóricos persistem com recuperação parcial, mantendo-se abaixo dos valores basais até o final do experimento, porém, sem diferença significativa entre os grupos. A recuperação dos valores da FC foi similar nos grupos de tratamento, chegando ao final do experimento com recuperação dos valores basais. (Tabela 03). Os dados de PAM relatados vão ao encontro aos apresentados por outros autores, os quais demonstram que a recuperação hemodinâmica propiciada com a ressuscitação com cristalóide não é mantida após 30 minutos do término da infusão de RL observando-se, a partir deste momento, diminuição da função hepatocelular além da redistribuição marcante do volume infundido. (Bickell et al., 1992; Rizoli,

2003;Shah et al., 2002;Wang et al., 1996) De acordo com os dados apresentados na Tabela 04, o grupo tratado com RL apresentou, ao final do experimento, peso significativamente maior do que o grupo tratado com SSH. Este dado pode ser explicado pela redistribuição de volume que ocorre após ressuscitação com grandes quantidades de solução hipo ou isotônicas, pelo edema e pela transferência de líquidos para o 3º espaço.

Os grupos apresentaram queda do hematócrito de maneira similar após o choque. Independente do regime de ressuscitação utilizado o hematócrito permaneceu com valores baixos até o final do experimento, demonstrando que apesar da grande diferença de volume infundido das soluções, a hemodiluição resultante foi equivalente.

A produção de bile pelo fígado é diretamente dependente da bomba Na^+/K^+ ATPase nas membranas celulares, a qual é extremamente sensível ao choque. Mudanças no fluxo biliar após o choque e ressuscitação correspondem à verdadeira dimensão do aporte sangüíneo aos hepatócitos.(Corso et al., 1998)

Encontra-se demonstrado na literatura que o choque diminui ou até cessa o fluxo biliar, havendo uma melhora parcial com a ressuscitação, em torno de 70% dos níveis basais (Adkison et al., 1986;Corso et al., 1999). Quando comparados os resultados nos três grupos, após 6 horas da ressuscitação verificamos uma redução significativa do fluxo biliar no grupo RL quando comparado ao grupo controle, correspondendo a 53% deste, também sendo significativamente menor que o grupo SSH. O fluxo biliar do grupo SSH correspondeu a 75% do grupo controle. Estes dados demonstram categoricamente a superioridade da terapia

com SSH na restituição do fluxo microcirculatório nutritivo hepático, enquanto que o tratamento com RL não foi suficiente para reverter a depressão metabólica do estado de choque 6 horas após o seu tratamento.

A redução do fluxo sanguíneo hepático, a queda da PO_2 , o metabolismo anaeróbico, e a depleção das reservas de ATP levam ao aumento da permeabilidade celular com conseqüente liberação de enzimas citosólicas, como as transaminases. A ALT é liberada dos hepatócitos na proporção do grau de lesão celular sendo usada como marcador de disfunção hepática (Adkison et al., 1986;Jarrar et al., 2000;Kyriakides et al., 2000).

Em nosso estudo, em concordância com os dados publicados por Jarrar e cols, o choque e ressuscitação provocaram aumento da ALT nos grupos RL e SSH (Jarrar et al., 2000). Entretanto, este aumento, após 6 horas de ressuscitação, foi significativamente atenuado no grupo SSH . A melhora do fluxo biliar e o menor aumento da ALT no grupo SSH sugerem a melhora do aporte nutricional ao fígado obtido com o uso desta solução, com nítida melhora da perfusão celular e menor grau de lesão hepatocelular.

A dosagem de MPO tem sido proposta como índice de recrutamento neutrofílico. A MPO é uma enzima encontrada nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, sendo assim considerada uma medida indireta da infiltração neutrofílica tecidual (McCormick et al., 2003;Serteser et al., 2002;Suzuki et al., 1993). Embora o acúmulo precoce de neutrófilos no parênquima hepático tenha sido demonstrado durante as fases de choque e ressuscitação inicial, registrando-se grandes aumentos nos índices de MPO já após 30 min de isquemia seguidos

de 1 hora de ressuscitação (Serteser et al., 2002), possivelmente o potencial deletério dos neutrófilos vá atingir sua plenitude apenas mais tardiamente, após 5 ou 6 horas, quando o processo de migração para o tecido estiver plenamente estabelecido. (Corso et al., 1999; Serracino-Inglott et al., 2001)

Após 6 horas de ressuscitação, quando comparamos os resultados da MPO nos grupos, verificamos uma diferença significativa no grupo RL em relação ao grupo SSH. Entretanto, não houve diferença significativa do grupo SSH para o grupo controle, demonstrando acentuada redução dos neutrófilos no parênquima hepático deste grupo.

A estagnação leucocitária nos sinusóides reflete uma ativação sistêmica destas células mediada pelo choque, determinando maior rigidez e aumento de volume celular com conseqüente aumento na resistência ao fluxo na microcirculação. Essa estagnação é sensivelmente atenuada com a ressuscitação com SSH (Corso et al., 1999). Nossos resultados comprovam este efeito da SSH após 6 horas do tratamento através dos valores menores de MPO mensurados após sua utilização, e pelo escore histopatológico de infiltração neutrofílica significativamente menor em comparação ao grupo RL. O escore de lesão histopatológica também sugere diminuição da congestão sinusoidal hepática obtida com a ressuscitação hipertônica.

A atividade das enzimas CAT e SOD no tecido hepático são medidas do status antioxidante deste tecido. (Klamt et al., 2001) Os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, gerados durante a ressuscitação, participam do fenômeno de adesão leucocitária induzida pela reperusão, sendo este fenômeno inibido pela

SOD e pela CAT, enzimas antioxidantes endógenas.(Menger et al., 1992a) Apesar de trabalhos mostrarem como resultado a queda significativa da atividade da SOD e da CAT durante a I/R (Menger et al., 1992a;Serracino-Inglott et al., 2001;Serteser et al., 2002) nossos resultados, após 6 horas de ressuscitação, não demonstraram uma diminuição nos valores dosados destas enzimas quando comparados os grupos de tratamento com o grupo controle.

Os hepatócitos dos ratos são extremamente ricos nessas defesas antioxidantes (CAT, SOD) principalmente na região peri-portal. (Kato et al., 2001;Serracino-Inglott et al., 2001). Nossos resultados, sem alteração na atividade da SOD e da CAT nos grupos de tratamento, podem ser devidos às grandes reservas de enzimas antioxidantes nos hepatócitos dos ratos, ou talvez à necessidade de aferição após um período mais longo de ressuscitação.

Um dos métodos mais freqüentemente utilizados para a avaliação da peroxidação lipídica das membranas celulares é a medida dos radicais tóxicos do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Dal Pizzol et al., 2000;Ozguc et al., 2003;Serteser et al., 2002). O TBARS mede a peroxidação dos ácidos araquidônicos e decosaenoico, especialmente o malondialdeído e seus precursores. (Planas e GarciaPlanas and Garcia, 1997). Assim como a proteína carbonilada, o TBARS tem sido amplamente usado como um índice de lesão oxidativa celular.(Koken et al., 2004;Ritter et al., 2003)

Refsgaard e cols identificaram a formação de proteína carbonilada como um produto resultante direto da peroxidação lipídica das membranas celulares. A proteína carbonilada pode ser resultante da ação direta dos RLO ou indiretamente,

através do subproduto da peroxidação lipídica. (Griffiths and Aldred, 2004; Refsgaard et al., 2000)

Nossos resultados demonstram aumentos expressivos do TBARS e da proteína carbonilada no grupo tratado com RL indicando uma maior lesão oxidativa e maior peroxidação lipídica das membranas celulares neste grupo, concordando com os achados de Bauer e colaboradores que observaram aumento significativo nos índices de TBARS em camundongos submetidos a choque hemorrágico e ressuscitados com RL quando comparados à ressuscitação hipertônica. (Bauer et al., 1999) A diminuição significativa nos índices tanto de TBARS como de proteína carbonilada do grupo tratado com SSH, representando atenuação da peroxidação lipídica das membranas celulares hepáticas, sugere melhora do fluxo sanguíneo aos hepatócitos, com atenuação do ciclo de anaerobiose nestas células, já que o choque hemorrágico seguido de ressuscitação pode levar a lesão hepatocelular principalmente na região pericentral do ácino (necrose pericentral) onde a concentração de O₂ é cerca de duas vezes menor do que na região periportal. (Kato et al., 2001; Paxian et al., 2001)

Estudos com fígados de ratos isquêmicos mostraram que a localização do estresse oxidativo nas células parenquimatosas foi diferente de acordo com o tempo de duração da ressuscitação. A morte celular foi identificada na região periportal após 30 minutos de ressuscitação e se estende à zona média após 60 minutos de ressuscitação, caracteristicamente em uma lesão representada em forma de “anel”. Isso corresponde às áreas onde o estresse oxidativo ocorre. Não

parece haver morte celular provocada pelo estresse oxidativo após 60 minutos de ressuscitação na região pericentral (veia pós-sinusoidal). Nessa região, a morte celular pode ser atribuída a isquemia por si só. (Kato et al., 2001)

Nosso modelo experimental apresentou necrose celular distribuída igualmente no parênquima hepático dos cortes histológicos analisados entre os grupos RL e SSH. Entretanto, há um aumento significativo ($p < 0,05$) do escore de necrose celular no grupo RL quando comparado ao grupo controle, sugerindo maior nível de lesão parenquimatosa neste grupo. Em ambos os grupos tratados a necrose celular hepática foi identificada, de maneira mais acentuada, na região pericentral (veia pós-sinusoidal). Esta localização pode ser explicada pelo fato dos grupos terem sido submetidos ao mesmo período de isquemia (60 minutos), sendo esta, provavelmente, a responsável direta pela necrose dos hepatócitos. Portanto, poderia haver uma discreta atenuação dos efeitos diretos da isquemia no parênquima hepático nos animais tratados com a SSH, embora não exista diferença estatística para o grupo RL.

Durante estágios tardios de isquemia, foram identificadas áreas de necrose hepática focal margeadas por um grande número de leucócitos PMN (Guan et al., 2002). Este dado foi confirmado em nossos achados e encontra-se ilustrado pela figura 15.

Como já demonstrado pelos resultados de outros autores (Corso et al., 1999; Pascual et al., 2003), os valores de MPO e os escores anatomopatológicos de infiltração neutrofílica e de congestão sinusoidal significativamente menores no grupo SSH sugerem que a ressuscitação com SSH atenua significativamente a

infiltração neutrofílica, assim como diminui a congestão sinusoidal hepática. O mecanismo proposto para justificar esta melhora é a remoção de líquido do endotélio microvascular, das hemácias e do interstício para o meio intravascular. Este mecanismo é mediado pelo aumento da osmolaridade plasmática obtido com o uso da SSH. Além disso, a SSH atua diretamente sobre a superfície do endotélio e dos leucócitos PMN diminuindo acentuadamente a expressão das moléculas de adesão celular, conseqüentemente reduzindo as interações leucócito-endotélio. (Pascual et al., 2002; Rotstein, 2000; Vollmar et al., 1996).

De maneira inversa, a ressuscitação com RL demonstrou causar ativação neutrofílica após o choque hemorrágico, aumentando a adesão ao endotélio, a migração para o interstício e conseqüentemente a lesão celular pelos RLO (“reflow paradox”) (Rhee et al., 1998). Este aspecto é sugerido pela significativa elevação da MPO neste grupo, assim como pelo maior escore histopatológico de infiltração neutrofílica.

Em nosso modelo experimental de choque hemorrágico e ressuscitação, obtivemos como resultados uma melhora da função hepática, determinada pela recuperação do fluxo biliar aos níveis basais, uma menor perda da integridade hepática, identificada pelos valores menores de bilirrubinas, ALT e escore histopatológico, assim como uma diminuição do estresse oxidativo, indicado pelos níveis menores da MPO, do TBARS e da proteína carbonilada, no grupo tratado com a Solução Salina Hipertônica. Esses resultados sugerem que a ressuscitação com SSH seja superior ao RL nos aspectos avaliados. Finalmente podemos

sugerir que, após 6 horas da ressuscitação do choque hemorrágico, a SSH foi superior ao RL nos parâmetros avaliados.

6. CONCLUSÕES

- Os grupos não apresentaram diferença na recuperação tardia dos parâmetros macro-hemodinâmicos de pressão arterial média e de frequência cardíaca.
- A hemodiluição, avaliada pelo hematócrito, resultante do uso das duas soluções, foi equivalente.
- Houve significativa melhora da função celular hepática com o uso da solução salina hipertônica, determinada pela recuperação do fluxo biliar.
- A integridade do parênquima hepático, avaliada pelas bilirrubinas, pela alanino aminotransferase e pelo escore histopatológico de lesão, foi preservada no grupo SSH.
- Não houve alteração na atividade das enzimas antioxidantes endógenas (catalase e superóxido dismutase) nos grupos.
- O uso da SSH atenuou os efeitos do estresse oxidativo demonstrado pelos índices menores de MPO, de TBARS e de proteína carbonilada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências ordenadas com auxílio do software *Reference Manager*[®]

Adkison,D, M E Hollwarth, J N Benoit, D A Parks, J M McCord, D N Granger, 1986, Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver: Acta Physiol Scand.Suppl, v. 548, p. 101-107.

Alderson,P, G Schierhout, I Roberts, F Bunn, 2000, Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients: Cochrane.Database.Syst.Rev., p. CD000567.

Angle,N, R Cabello-Passini, D B Hoyt, W H Loomis, A Shreve, S Namiki, W G Junger, 2000, Hypertonic saline infusion: can it regulate human neutrophil function?: Shock, v. 14, p. 503-508.

ATLS - American College of Surgeons, 1997, Advanced Trauma Life Support - Instructor Manual, p. 28,99.

Bauer,C, F Walcher, M Holanda, F Mertzlufft, R Larsen, I Marzi, 1999, Antioxidative resuscitation solution prevents leukocyte adhesion in the liver after hemorrhagic shock: J.Trauma, v. 46, p. 886-893.

Bickell,WH, S P Bruttig, G A Millnamow, J O'Benar, C E Wade, 1992, Use of hypertonic saline/dextran versus lactated Ringer's solution as a resuscitation fluid

after uncontrolled aortic hemorrhage in anesthetized swine: *Ann. Emerg. Med.*, v. 21, p. 1077-1085.

Chaudry, IH, T S Samy, M G Schwacha, P Wang, L W Rue, III, K I Bland, 2003, Endocrine targets in experimental shock: *J. Trauma*, v. 54, p. S118-S125.

Choi, PT, G Yip, L G Quinonez, D J Cook, 1999, Crystalloids vs. colloids in fluid resuscitation: a systematic review: *Crit Care Med.*, v. 27, p. 200-210.

Ciesla, DJ, E E Moore, W L Biffl, R J Gonzalez, C C Silliman, 2001, Hypertonic saline attenuation of the neutrophil cytotoxic response is reversed upon restoration of normotonicity and reestablished by repeated hypertonic challenge: *Surgery*, v. 129, p. 567-575.

Ciesla, DJ, E E Moore, G Zallen, W L Biffl, C C Silliman, 2000, Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything: *J. Trauma*, v. 48, p. 388-395.

Coimbra, R, W G Junger, D B Hoyt, F C Liu, W H Loomis, M F Evers, 1996, Hypertonic saline resuscitation restores hemorrhage-induced immunosuppression by decreasing prostaglandin E2 and interleukin-4 production: *J. Surg. Res.*, v. 64, p. 203-209.

Corso, CO, S Okamoto, R Leiderer, K Messmer, 1998, Resuscitation with hypertonic saline dextran reduces endothelial cell swelling and improves hepatic

microvascular perfusion and function after hemorrhagic shock: *J.Surg.Res.*, v. 80, p. 210-220.

Corso,CO, S Okamoto, D Ruttinger, K Messmer, 1999, Hypertonic saline dextran attenuates leukocyte accumulation in the liver after hemorrhagic shock and resuscitation: *J.Trauma*, v. 46, p. 417-423.

Dal Pizzol,F, F Klamt, M S Benfato, E A Bernard, J C Moreira, 2001, Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells: *Free Radic.Res.*, v. 34, p. 395-404.

Dal Pizzol,F, F Klamt, M M Vianna, N Schroder, J Quevedo, M S Benfato, J C Moreira, R Walz, 2000, Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats: *Neurosci.Lett.*, v. 291, p. 179-182.

de,FJ, Jr., J Timoner, I T Velasco, O U Lopes, Rocha-e-Silva, 1980, Treatment of refractory hypovolaemic shock by 7.5% sodium chloride injections: *Lancet*, v. 2, p. 1002-1004.

Deb,S, B Martin, L Sun, P Ruff, D Burris, N Rich, S DeBreux, B Austin, P Rhee, 1999, Resuscitation with lactated Ringer's solution in rats with hemorrhagic shock induces immediate apoptosis: *J.Trauma*, v. 46, p. 582-588.

Deitch,EA, H P Shi, E Feketeova, C J Hauser, D Z Xu, 2003, Hypertonic saline resuscitation limits neutrophil activation after trauma-hemorrhagic shock: Shock, v. 19, p. 328-333.

Dubick,MA, J M Davis, T Myers, C E Wade, G C Kramer, 1995, Dose response effects of hypertonic saline and dextran on cardiovascular responses and plasma volume expansion in sheep: Shock, v. 3, p. 137-144.

Durham,RM, J J Moran, J E Mazuski, M J Shapiro, A E Baue, L M Flint, 2003, Multiple organ failure in trauma patients: J.Trauma, v. 55, p. 608-616.

Eversole,RR, S L Smith, L J Beuving, E D Hall, 1993, Protective effect of the 21-aminosteroid lipid peroxidation inhibitor tirilazad mesylate (U74006F) on hepatic endothelium in experimental hemorrhagic shock: Circ.Shock, v. 40, p. 125-131.

Felippe J.,Jr, J Timoner, I T Velasco, O U Lopes, Rocha-e-Silva, 1980, Treatment of refractory hypovolaemic shock by 7.5% sodium chloride injections: Lancet, v. 2, p. 1002-1004.

Giannoudis,PV, 2003, Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update: Injury, v. 34, p. 397-404.

Gonzalez,RJ, E E Moore, D J Ciesla, J R Neto, W L Biffl, C C Silliman, 2002, Hyperosmolarity abrogates neutrophil cytotoxicity provoked by post-shock mesenteric lymph: Shock, v. 18, p. 29-32.

Granger,DN, M E Hollwarth, D A Parks, 1986a, Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals: *Acta Physiol Scand.Suppl*, v. 548, p. 47-63.

Granger,DN, M E Hollwarth, D A Parks, 1986b, Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals: *Acta Physiol Scand.Suppl*, v. 548, p. 47-63.

Griffiths,A, S Aldred, 2004, Oxidation of protein in human low-density lipoprotein exposed to peroxy radicals facilitates uptake by monocytes; protection by antioxidants in vivo: *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 15, p. 111-117.

Guan,J, D D Jin, L J Jin, Q Lu, 2002, Apoptosis in organs of rats in early stage after polytrauma combined with shock: *J.Trauma*, v. 52, p. 104-111.

Gurfinkel,V, R S Poggetti, B Fontes, F C Ferreira Novo, D Birolini, 2003, Hypertonic saline improves tissue oxygenation and reduces systemic and pulmonary inflammatory response caused by hemorrhagic shock: *J.Trauma*, v. 54, p. 1137-1145.

Gushchin,V, S Stegalkina, H B Alam, J R Kirkpatrick, P M Rhee, E Koustova, 2002, Cytokine expression profiling in human leukocytes after exposure to hypertonic and isotonic fluids: *J.Trauma*, v. 52, p. 867-871.

Jarrar,D, P Wang, W G Cioffi, K I Bland, I H Chaudry, 2000, Critical role of oxygen radicals in the initiation of hepatic depression after trauma hemorrhage: *J.Trauma*, v. 49, p. 879-885.

Junger,WG, R Coimbra, F C Liu, C Herdon-Remelius, W Junger, H Junger, W Loomis, D B Hoyt, A Altman, 1997, Hypertonic saline resuscitation: a tool to modulate immune function in trauma patients?: Shock, v. 8, p. 235-241.

Kato,Y, J Tanaka, K Koyama, 2001, Intralobular heterogeneity of oxidative stress and cell death in ischemia-reperfused rat liver: J.Surg.Res., v. 95, p. 99-106.

Klamt,F, F Dal Pizzol, Conte da Frota ML JR, R Walz, M E Andrades, E G da Silva, R R Brentani, I Izquierdo, J C Fonseca Moreira, 2001, Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein: Free Radic.Biol.Med., v. 30, p. 1137-1144.

Koken,T, M Serteser, A Kahraman, G Akbulut, O N Dilek, 2004, Which is more effective in the prevention of renal ischemia-reperfusion-induced oxidative injury in the early period in mice: interleukin (IL)-10 or anti-IL-12?: Clin.Biochem., v. 37, p. 50-55.

Koustova,E, K Stanton, V Gushchin, H B Alam, S Stegalkina, P M Rhee, 2002, Effects of lactated Ringer's solutions on human leukocytes: J.Trauma, v. 52, p. 872-878.

Kramer,GC, 2003, Hypertonic resuscitation: physiologic mechanisms and recommendations for trauma care: J.Trauma, v. 54, p. S89-S99.

Kreimeier,U, L Frey, K Messmer, 1993, Small-volume rususcitation: Curr.Opin.Anesthesiol., v. 6.

Kreimeier,U, K Messmer, 2002, Small-volume resuscitation: from experimental evidence to clinical routine. Advantages and disadvantages of hypertonic solutions: *Acta Anaesthesiol.Scand.*, v. 46, p. 625-638.

Kretschmar,K, T Engelhardt, 1994, Swelling of capillary endothelial cells contributes to traumatic hemorrhagic shock-induced microvascular injury: a morphologic and morphometric analysis: *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.*, v. 14, p. 45-49.

Kyriakides,C, W G Austen, Jr., Y Wang, J Favuzza, F D Moore, Jr., H B Hechtman, 2000, Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent: *J.Trauma*, v. 48, p. 32-38.

Liener,UC, U B Bruckner, M W Knoferl, G Steinbach, L Kinzl, F Gebhard, 2002, Chemokine activation within 24 hours after blunt accident trauma: *Shock*, v. 17, p. 169-172.

Liu,LM, J A Ward, M A Dubick, 2003, Effects of crystalloid and colloid resuscitation on hemorrhage-induced vascular hyporesponsiveness to norepinephrine in the rat: *J.Trauma*, v. 54, p. S159-S168.

Maningas,PA, 1987, Resuscitation with 7.5% NaCl in 6% dextran-70 during hemorrhagic shock in swine: effects on organ blood flow: *Crit Care Med.*, v. 15, p. 1121-1126.

Markin,RS, J L Wisecarver, S J Radio, R J Stratta, A N Langnas, K Hirst, B W Shaw, Jr., 1993, Frozen section evaluation of donor livers before transplantation: Transplantation, v. 56, p. 1403-1409.

Martinez-Mier,G, L H Toledo-Pereyra, P A Ward, 2000, Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion: J.Surg.Res., v. 94, p. 185-194.

Matsuoka,T, J Hildreth, D H Wisner, 1995, Liver injury as a model of uncontrolled hemorrhagic shock: resuscitation with different hypertonic regimens: J.Trauma, v. 39, p. 674-680.

Mattox,KL, P A Maningas, E E Moore, J R Mateer, J A Marx, C Aprahamian, J M Burch, P E Pepe, 1991, Prehospital hypertonic saline/dextran infusion for post-traumatic hypotension. The U.S.A. Multicenter Trial: Ann.Surg., v. 213, p. 482-491.

McCormick,PH, G Chen, S Tierney, C J Kelly, D J Bouchier-Hayes, 2003, Clinically relevant thermal preconditioning attenuates ischemia-reperfusion injury: J.Surg.Res., v. 109, p. 24-30.

McEver,RP, 1992, Leukocyte-endothelial cell interactions: Curr.Opin.Cell Biol., v. 4, p. 840-849.

McFarlane,C, A Lee, 1994, A comparison of Plasmalyte 148 and 0.9% saline for intra-operative fluid replacement: Anaesthesia, v. 49, p. 779-781.

Menger,MD, S Pelikan, D Steiner, K Messmer, 1992a, Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox": Am.J.Physiol, v. 263, p. H1901-H1906.

Menger,MD, D Steiner, K Messmer, 1992b, Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow": Am.J.Physiol, v. 263, p. H1892-H1900.

Messmer K, Kreimeier U. Microcirculatory therapy in shock. Resuscitation 18. 1989.

Ref Type: Generic

Messmer K, Lehr HA, Saetzler RK, Thiel M, K E Arfors, 1996, Microvascular Salvage by Small Volume Resuscitation with Hypertonic Fluids, p. 167-180.

Murao,Y, M Hata, K Ohnishi, K Okuchi, Y Nakajima, Y Hiasa, W G Junger, D B Hoyt, T Ohnishi, 2003a, Hypertonic saline resuscitation reduces apoptosis and tissue damage of the small intestine in a mouse model of hemorrhagic shock: Shock, v. 20, p. 23-28.

Murao,Y, W Loomis, P Wolf, D B Hoyt, W G Junger, 2003b, Effect of dose of hypertonic saline on its potential to prevent lung tissue damage in a mouse model of hemorrhagic shock: Shock, v. 20, p. 29-34.

Nakayama,S, L Sibley, R A Gunther, J W Holcroft, G C Kramer, 1984a, Small-volume resuscitation with hypertonic saline (2,400 mOsm/liter) during hemorrhagic shock: *Circ.Shock*, v. 13, p. 149-159.

Nakayama,S, L Sibley, R A Gunther, J W Holcroft, G C Kramer, 1984b, Small-volume resuscitation with hypertonic saline (2,400 mOsm/liter) during hemorrhagic shock: *Circ.Shock*, v. 13, p. 149-159.

National Center for Health Statistics. National Vital Statistics Reports. 52[3]. 2003.

Ref Type: Generic

Ozguc,H, R Tokyay, N Kahveci, Z Serdar, E S Gur, 2003, Hypertonic saline dextran alleviates hepatic injury in hypovolemic rats undergoing porta hepatis occlusion: *Shock*, v. 19, p. 383-387.

Pacheco,AM, Jr., R Coimbra, U Kreimeier, U B Bruckner, L Frey, S Niemczyk, K Messmer, 1994, Hypertonic vs isotonic saline solution for primary resuscitation from severe hypovolemia: Effect on hemodynamics and extravascular lung water.: *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 9, p. 72-80.

Partrick,DA, E E Moore, P J Offner, J L Johnson, D Y Tamura, C C Silliman, 1998, Hypertonic saline activates lipid-primed human neutrophils for enhanced elastase release: *J.Trauma*, v. 44, p. 592-597.

Pascual,JL, L E Ferri, A J Seely, G Campisi, P Chaudhury, B Giannias, D C Evans, T Razek, R P Michel, N V Christou, 2002, Hypertonic saline resuscitation of

hemorrhagic shock diminishes neutrophil rolling and adherence to endothelium and reduces in vivo vascular leakage: *Ann.Surg.*, v. 236, p. 634-642.

Pascual,JL, K A Khwaja, P Chaudhury, N V Christou, 2003, Hypertonic saline and the microcirculation: *J.Trauma*, v. 54, p. S133-S140.

Paxian,M, H Rensing, I Bauer, M Bauer. Molecular Mechanisms of Hepatocellular Injury after Hemorrhagic Shock. *Shock* 15[S1], 17. 2001.

Ref Type: Abstract

Paxian,M, H Rensing, K Geckeis, I Bauer, D Kubulus, D R Spahn, M Bauer, 2003, Perflubron emulsion in prolonged hemorrhagic shock: influence on hepatocellular energy metabolism and oxygen-dependent gene expression: *Anesthesiology*, v. 98, p. 1391-1399.

Planas,M, A Garcia, 1997, [Lipid peroxidation in critical patients]: *Nutr.Hosp.*, v. 12, p. 233-236.

Refsgaard,HH, L Tsai, E R Stadtman, 2000, Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 97, p. 611-616.

Rensing,H, I Bauer, V Datene, C Patau, B H Pannen, M Bauer, 1999, Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation: *Crit Care Med.*, v. 27, p. 2766-2775.

Rhee,P, D Burris, C Kaufmann, M Pikoulis, B Austin, G Ling, D Harviel, K Waxman, 1998, Lactated Ringer's solution resuscitation causes neutrophil activation after hemorrhagic shock: J.Trauma, v. 44, p. 313-319.

Ritter,C, M Andrades, M L Frota, Jr., F Bonatto, R A Pinho, M Polydoro, F Klamt, C T Pinheiro, S S Menna-Barreto, J C Moreira, F Dal Pizzol, 2003, Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation: Intensive Care Med..

Rizoli,SB, 2003, Crystalloids and colloids in trauma resuscitation: a brief overview of the current debate: J.Trauma, v. 54, p. S82-S88.

Rizoli,SB, A Kapus, J Parodo, J Fan, O D Rotstein, 1999, Hypertonic immunomodulation is reversible and accompanied by changes in CD11b expression: J.Surg.Res., v. 83, p. 130-135.

Rocha-e-Silva, G A Negraes, A M Soares, V Pontieri, L Loppnow, 1986, Hypertonic resuscitation from severe hemorrhagic shock: patterns of regional circulation: Circ.Shock, v. 19, p. 165-175.

Rotstein,OD, 2000, Novel strategies for immunomodulation after trauma: revisiting hypertonic saline as a resuscitation strategy for hemorrhagic shock: J.Trauma, v. 49, p. 580-583.

Sakamoto,S, T Okanoue, Y Itoh, Y Nakagawa, H Nakamura, A Morita, Y Daimon, K Sakamoto, N Yoshida, T Yoshikawa, K Kashima, 2002, Involvement of Kupffer

cells in the interaction between neutrophils and sinusoidal endothelial cells in rats: Shock, v. 18, p. 152-157.

Samarasinghe,DA, M Tapner, G C Farrell, 2000, Role of oxidative stress in hypoxia-reoxygenation injury to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells: Hepatology, v. 31, p. 160-165.

Schauer,RJ, A L Gerbes, D Vonier, H Meissner, P Michl, R Leiderer, F W Schildberg, K Messmer, M Bilzer, 2004, Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia: Ann.Surg., v. 239, p. 220-231.

Scheingraber,S, M Rehm, C Sehmisch, U Finsterer, 1999, Rapid saline infusion produces hyperchloremic acidosis in patients undergoing gynecologic surgery: Anesthesiology, v. 90, p. 1265-1270.

Schierhout,G, I Roberts, 1998, Fluid resuscitation with colloid or crystalloid solutions in critically ill patients: a systematic review of randomised trials: BMJ, v. 316, p. 961-964.

Schwedhelm,E, R Maas, R Troost, R H Boger, 2003, Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress: Clin.Pharmacokinet., v. 42, p. 437-459.

Serracino-Inglott,F, N A Habib, R T Mathie, 2001, Hepatic ischemia-reperfusion injury: Am.J.Surg., v. 181, p. 160-166.

Serteser,M, T Koken, A Kahraman, K Yilmaz, G Akbulut, O N Dilek, 2002, Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice: *J.Surg.Res.*, v. 107, p. 234-240.

Shah,KJ, W C Chiu, T M Scalea, D E Carlson, 2002, Detrimental effects of rapid fluid resuscitation on hepatocellular function and survival after hemorrhagic shock: *Shock*, v. 18, p. 242-247.

Shi,HP, E A Deitch, Z Da Xu, Q Lu, C J Hauser, 2002, Hypertonic saline improves intestinal mucosa barrier function and lung injury after trauma-hemorrhagic shock: *Shock*, v. 17, p. 496-501.

Shields,CJ, A W O'Sullivan, J H Wang, D C Winter, W O Kirwan, H P Redmond, 2003, Hypertonic saline enhances host response to bacterial challenge by augmenting receptor-independent neutrophil intracellular superoxide formation: *Ann.Surg.*, v. 238, p. 249-257.

Stern,SA, S Jwayyed, S C Dronen, X Wang, 2000, Resuscitation of severe uncontrolled hemorrhage: 7.5% sodium chloride/6% dextran 70 vs 0.9% sodium chloride: *Acad.Emerg.Med.*, v. 7, p. 847-856.

Suzuki,S, L H Toledo-Pereyra, F J Rodriguez, D Cejalvo, 1993, Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine: *Transplantation*, v. 55, p. 1265-1272.

Traverso,LW, R F Bellamy, S J Hollenbach, L D Witcher, 1987, Hypertonic sodium chloride solutions: effect on hemodynamics and survival after hemorrhage in swine: *J.Trauma*, v. 27, p. 32-39.

Vassar,MJ, R P Fischer, P E O'Brien, B L Bachulis, J A Chambers, D B Hoyt, J W Holcroft, 1993, A multicenter trial for resuscitation of injured patients with 7.5% sodium chloride. The effect of added dextran 70. The Multicenter Group for the Study of Hypertonic Saline in Trauma Patients: *Arch.Surg.*, v. 128, p. 1003-1011.

Velasco,IT, V Pontieri, Rocha e Silva, O U Lopes, 1980, Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock: *Am.J.Physiol*, v. 239, p. H664-H673.

Victorino,GP, C R Newton, B Curran, 2002, The effect of tonicity and hypertonic solutions on microvascular permeability: *J.Surg.Res.*, v. 104, p. 101-105.

Vollmar,B, S Richter, M D Menger, 1996, Leukocyte stasis in hepatic sinusoids: *Am.J.Physiol*, v. 270, p. G798-G803.

Wade,CE, J J Grady, G C Kramer, 2003, Efficacy of hypertonic saline dextran fluid resuscitation for patients with hypotension from penetrating trauma: *J.Trauma*, v. 54, p. S144-S148.

Wade,CE, J P Hannon, C A Bossone, M M Hunt, J A Loveday, R Coppes, V L Gildengorin, 1989, Resuscitation of conscious pigs following hemorrhage: comparative efficacy of small-volume resuscitation: *Circ.Shock*, v. 29, p. 193-204.

Wade,CE, G C Kramer, J J Grady, T C Fabian, R N Younes, 1997, Efficacy of hypertonic 7.5% saline and 6% dextran-70 in treating trauma: a meta-analysis of controlled clinical studies: *Surgery*, v. 122, p. 609-616.

Walsh,TR, P N Rao, L Makowka, T E Starzl, 1990, Lipid peroxidation is a nonparenchymal cell event with reperfusion after prolonged liver ischemia: *J.Surg.Res.*, v. 49, p. 18-22.

Wang,P, Z F Ba, A Biondo, I Chaudry, 1996, Liver endothelial cell dysfunction occurs early following hemorrhagic shock and persists despite crystalloid resuscitation: *J.Surg.Res.*, v. 63, p. 241-247.

Wang,P, Z F Ba, J Burkhardt, I H Chaudry, 1992, Measurement of hepatic blood flow after severe hemorrhage: lack of restoration despite adequate resuscitation: *Am.J.Physiol*, v. 262, p. G92-G98.

Wang,P, Z F Ba, I H Chaudry, 1993, Endothelial cell dysfunction occurs very early following trauma-hemorrhage and persists despite fluid resuscitation: *Am.J.Physiol*, v. 265, p. H973-H979.

Wang,P, I H Chaudry, 1991, Crystalloid resuscitation restores but does not maintain cardiac output following severe hemorrhage: *J.Surg.Res.*, v. 50, p. 163-169.

Williams,EL, K L Hildebrand, S A McCormick, M J Bedel, 1999, The effect of intravenous lactated Ringer's solution versus 0.9% sodium chloride solution on serum osmolality in human volunteers: *Anesth.Analg.*, v. 88, p. 999-1003.

Yamakawa,Y, M Takano, M Patel, N Tien, T Takada, G B Bulkley, 2000, Interaction of platelet activating factor, reactive oxygen species generated by xanthine oxidase, and leukocytes in the generation of hepatic injury after shock/resuscitation: *Ann.Surg.*, v. 231, p. 387-398.

Younes,RN, F Aun, C T Ching, D C Goldenberg, M H Franco, F K Miura, S S Santos, I M Sequeiros, Rocha e Silva, I Fujimura, D Birolini, 1997, Prognostic factors to predict outcome following the administration of hypertonic/hyperoncotic solution in hypovolemic patients: *Shock*, v. 7, p. 79-83.