



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DANILLO MENEZES DOS SANTOS

**EFEITO DA HIDRALAZINA NA SOBREVIDA, NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
NO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO ANIMAL DE SEPSE**

ARACAJU – SE

2021

	<p>DANILLO MENEZES DOS SANTOS</p> <p>EFETOS DA HIDRALAZINA NA SOBREVIDA, NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E NO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO ANIMAL DE SEPSE</p> <p>2021</p>
--	--

DANILLO MENEZES DOS SANTOS

**EFEITO DA HIDRALAZINA NA SOBREVIDA, NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
NO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO ANIMAL DE SEPSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos (UFS)

Co-orientador: Prof. Dr. Igor Alexandre Cortes Menezes (UFPR)

ARACAJU

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237e	<p>Santos, Danillo Menezes dos Efeito da hidralazina na sobrevida, na resposta inflamatória e no estresse oxidativo em modelo animal de sepse / Danillo Menezes dos Santos ; orientador Márcio Roberto Viana dos Santos ; coorientador Igor Alexandre Cortes Menezes. – Aracaju, 2021. 115 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.</p> <p>1. Ciências da saúde. 2. Sepse. 3. Hidralazina. 4. Sobrevida. 5. Imunidade celular. 6. Citocinas. 7. Antioxidante. I. Santos, Márcio Roberto Viana dos, orient. II. Menezes, Igor Alexandre Cortes, coorient. III. Título.</p> <p>CDU 616.94</p>
-------	---

DANILLO MENEZES DOS SANTOS

**EFEITO DA HIDRALAZINA NA SOBREVIDA, NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
NO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO ANIMAL DE SEPSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 10/02/2021

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos
Universidade Federal de Sergipe

1º Examinador: Prof. Dr. Jamil Assreuy
Universidade Federal de Santa Catarina

2º Examinador: Prof. Dr. André Sales Barreto
Universidade Federal de Sergipe

3ª Examinadora: Profa. Dra. Luana Heimfarth
Universidade Federal de Sergipe

4º Examinador: Prof. Dr. Fabrício Nunes Macedo
Centro Universitário Estácio de Sergipe

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho àqueles que ajudaram e contribuíram com a realização desse momento. Em especial, aos meus pais, Maria do Carmo e José Everaldo, às minhas irmãs, Danielle e Priscila e ao meu sobrinho, Vicente, pelo amor, exemplo, apoio, incentivo, carinho e convivência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder o dom da vida, por me dar o suporte e a sabedoria necessários para enfrentar cada adversidade que, às vezes, a vida nos traz.

Aos meus pais Maria do Carmo e José Everaldo por todos os ensinamentos e valores que me foram passados. Educar não é uma tarefa fácil e, muitas vezes, precisamos errar para ir aprendendo. Agradeço por cada minuto dedicado a construção da minha educação e do meu caráter, vocês são meu modelo e alicerce. Amo vocês e muito obrigado por acreditarem em meu potencial.

A minhas irmãs Danielle e Priscila pelos momentos de convivência, descontração, conversas e partilhas.

Ao meu sobrinho Vicente que desde a sua chegada me ajuda a ser uma pessoa melhor a cada dia, mais tolerante, paciente. Te amo pequeno!

Aos meus familiares em geral, por todo apoio e incentivo que me deram.

Aos meus amigos, pela força e apoio que sempre me dão nos momentos em que eu preciso. E por entenderem os diversos momentos em que precisei me ausentar, devido às obrigações do Doutorado, que não foram poucas.

Ao orientador e amigo professor Márcio Roberto Viana dos Santos pela oportunidade em ter aceitado me orientar, por toda a confiança e os ensinamentos que me foram e são passados, pela paciência e compreensão pelos momentos em que apresentei alguma dificuldade.

Ao meu coorientador Igor Alexandre Cortes Menezes, pelas dúvidas retiradas, pela ajuda dada e pelos ensinamentos passados.

A família LAFAC/LANEF Bianca, Cácia, Eric Aian, Erik, Fabrício, Izabel, Jeferson, Jéssica, João (que sempre chegou junto na resolução das questões laboratoriais), Luana e Thallita (pelo aprendizado de cada uma das técnicas), Marília, Meire, Michael, Mikaella, Patrícia, Robervan, Wagner, Eliza e Yandra, pelos diversos momentos de diversão, troca de aprendizados, ajuda nos momentos de aperreio.

As parcerias com Diego, Tatianny, Adão e Jéssica, com quem tive a oportunidade de trabalhar e aprender um pouco mais sobre outras áreas.

Aos professores do LAFAC/LANEF André Sales Barreto, Jullyana de Souza Siqueira Quintans, Lucindo José Quintans Júnior, Rosana de Souza Siqueira Barreto, Adriana Gibara Guimarães e Valter Joviniano de Santana Filho, por todo aprendizado e confiança que me fora depositado durante todos esses anos, na resolução de diversos fatores relacionados a manutenção e ao funcionamento do laboratório. Gerador, ar condicionado, biotério, cota, compra de material, etc.

Aos professores Carla Maria Lins Vasconcelos, Danilo Lustrino Borges, Roberta Pereira Mirada Fernandes, Enilton Aparecido Camargo, pela ajuda e disponibilidade em emprestar material e/ou substâncias, por me confiar a chave dos respectivos laboratórios todas as vezes em que eu precisei utilizar algum equipamento.

Aos professores do PPGCS pelo constante conhecimento repassado contribuindo para a minha formação profissional.

Aos funcionários da UFS, em especial as meninas dos serviços gerais, Ninha e Vânia, pelas várias vezes em que me ajudaram.

Ao pessoal do programa PPGCS, em especial Érica, Patrícia e Gaby, por sempre serem tão solícitas e prestativas.

Aos momentos de derrota que nos impulsionam a crescer, a correr atrás e a buscar sempre melhorar. Aceitar que dar errado é condição necessária e suficiente para que as coisas comecem a dar certo, é algo que nos faz transcender.

A Universidade Federal de Sergipe por fornecer toda a estrutura necessária ao desenvolvimento dos trabalhos.

Às Agencias Fomentadoras CNPq, CAPES e FAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade de realizar este trabalho de Doutorado.

Aos animais que contribuíram para o desenvolvimento de cada experimento e para que eu chegasse a esse momento.

EPÍGRAFE

O futuro tem muitos nomes.
Para os fracos é o inalcançável.
Para os temerosos, o desconhecido.
Para os valentes é a oportunidade.

Victor Hugo

RESUMO

A sepse é caracterizada por uma resposta imunoinflamatória sistêmica amplificada produzida por um microrganismo. Seu mecanismo fisiopatológico é complexo e envolve a ativação de vias de sinalização de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo. Devido à alta mortalidade em pacientes internados em UTI, a comunidade científica tem buscado constantemente terapias seguras e eficazes para o tratamento da sepse. E, nesse contexto, a hidralazina (HDZ) é um forte candidato. Embora a HDZ seja mais conhecida como uma potente substância vasodilatadora e tenha sido frequentemente usado nas últimas cinco décadas como anti-hipertensivo, devido a sua segurança e ao baixo risco de causar toxicidade, estudos têm mostrado que ela também possui potentes propriedades antioxidantes, principalmente em relação à inibição da formação e sequestro de ERO e ERN *in vivo* e *in vitro*. Assim, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da hidralazina (HDZ) em mitigar a mortalidade, a resposta inflamatória e o estresse oxidativo induzida pela sepse, e investigar seus possíveis mecanismos de ações. A sepse foi induzida pelo método de ligadura e perfuração cecal (CLP) em ratos Wistar machos. Após a cirurgia, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: sham, sepse e sepse + HDZ (1 mg/kg, s.c; 4 h após a indução da sepse e depois de 12-12 horas até tempo de 48 h). Todos os grupos foram monitorados por 48 h para avaliar a taxa de sobrevivência, parâmetros clínicos, bioquímicos e celulares. Após a eutanásia, o sangue, baço, fígado e rins foram coletados para análise dos marcadores de danos lipídicos e proteicos, citocinas séricas do sangue, atividade de mieloperoxidase (MPO) e parâmetros de estresse oxidativo, através da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase. O envolvimento da via PI3K/Akt também foi investigado por western Blot nos tecidos do baço, fígado e rim. A sepse foi induzida com sucesso pela técnica CLP. A administração com HDZ aumentou: a taxa de sobrevivência (de 50 para 90%); a temperatura (de $33,3 \pm 0,2$ para $34,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$); a concentração da glicemia (de $87,6 \pm 2,8$ para $106,5 \pm 2,1$ mg/dL). O tratamento com HDZ reduziu: o escore de gravidade clínica de sepse (de $10,6 \pm 0,51$ para $6,5 \pm 0,40$ u.a.); a concentração do lactato (de $36,2 \pm 1,5$ para $18,03 \pm 1,1$ mg/dL); as concentrações das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 (de $10,2 \pm 0,3$; $99,1 \pm 10,7$; $1252 \pm 325,3$, respectivamente para $4,1 \pm 0,4$; $19,66 \pm 4,5$; $267 \pm 138,1$ pg/mL); a atividade da MPO no baço, fígado e rim (de $26,02 \pm 2,74$; $0,11 \pm 0,01$; $0,20 \pm 0,02$, respectivamente para $13,37 \pm 0,95$; $0,066 \pm 0,007$; $0,141 \pm 0,006$ U/g, respectivamente); as concentrações de TBARS (de $2,33 \pm 0,15$; $0,92 \pm 0,15$; $9,14 \pm 0,97$ para $1,47 \pm 0,07$; $0,48 \pm 0,06$; $4,34 \pm 0,36$ nmol/mg de proteína, respectivamente). Além disso, a HDZ preveniu significativamente o aumento da ativação da Akt no fígado e rins, mas não teve efeito no baço. A administração com HDZ mitigou amplamente os efeitos da sepse ao melhorar as respostas inflamatórias e antioxidantes por meio da via PI3K/Akt. Esses achados fornecem fortes evidências de que o HDZ pode ser uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da sepse.

Descritores: Sepse. Hidralazina. Sobrevida. Imunidade celular. Citocinas. Antioxidante.

ABSTRACT

Sepsis is characterized by an amplified systemic immunoinflammatory response produced by a microorganism. Its pathophysiological mechanism is complex and involves the activation of inflammatory cytokine signaling pathways and oxidative stress. Due to the high mortality in ICU patients, the scientific community has been constantly looking for safe and effective therapies for the treatment of sepsis. And in this context, hydralazine (HDZ) is a strong candidate. Although HDZ is best known as a potent vasodilating substance and has been used frequently in the past five decades as an antihypertensive, due to its safety and low risk of causing toxicity, studies have shown that it also has potent antioxidant properties, especially in inhibition of ROS and RNS formation and sequestration in vivo and in vitro. Thus, the main objective of this study was to evaluate the ability of hydralazine (HDZ) to mitigate mortality, the inflammatory response and oxidative stress induced by sepsis, and to investigate its possible mechanisms of action. Sepsis was induced by the ligation and cecal perforation (CLP) method in male Wistar rats. After surgery, the animals were randomly divided into three groups: sham, sepsis and sepsis + HDZ (1 mg/kg, s.c; 4 h after sepsis induction and after 12-12 hours until 48 h). All groups were monitored for 48 h to assess survival rate, clinical, biochemical and cellular parameters. After euthanasia, blood, spleen, liver and kidneys were collected for analysis of markers of lipid and protein damage, serum blood cytokines, myeloperoxidase activity (MPO) and oxidative stress parameters, through the activity of catalase and superoxide dismutase enzymes. The involvement of the PI3K/Akt pathway was also investigated by western blot in the tissues of the spleen, liver and kidney. Sepsis was successfully induced by the CLP technique. HDZ administration has increased: the survival rate (from 50 to 90%); the temperature (from 33.3 ± 0.2 to $34.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$); blood glucose concentration (from 87.6 ± 2.8 to 106.5 ± 2.1 mg/dL). HDZ treatment reduced: the clinical sepsis severity score (from 10.6 ± 0.51 to 6.5 ± 0.40 u.a.); the lactate concentration (from 36.2 ± 1.5 to 18.03 ± 1.1 mg/dL); the concentrations of cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-10 (from 10.2 ± 0.3 ; 99.1 ± 10.7 ; 1252 ± 325.3 , respectively to 4.1 ± 0.4 ; 19 , 66 ± 4.5 ; 267 ± 138.1 pg/mL); MPO activity in the spleen, liver and kidney (from 26.02 ± 2.74 ; 0.11 ± 0.01 ; 0.20 ± 0.02 , respectively to 13.37 ± 0.95 ; 0.066 ± 0.007 ; 0.141 ± 0.006 U / g, respectively); TBARS concentrations (from 2.33 ± 0.15 ; 0.92 ± 0.15 ; 9.14 ± 0.97 to 1.47 ± 0.07 ; 0.48 ± 0.06 ; 4.34 ± 0.36 nmol/mg protein, respectively). In addition, HDZ significantly prevented increased Akt activation in the liver and kidneys, but had no effect on the spleen. HDZ administration largely mitigated the effects of sepsis by improving inflammatory and antioxidant responses through the PI3K/Akt pathway. These findings provide strong evidence that HDZ may be a new therapeutic alternative for the treatment of sepsis.

Keywords: Sepsis; hydralazine; survival; cellular immunity; cytokines; antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Possíveis vias de sinalização alterada pela sepse.....	28
Figura 2: Sistemas acometidos pela sepse.....	31
Figura 3: Estrutura molecular da hidralazina.....	35
Figura 4: Fluxograma dos artigos incluídos na revisão sistemática.....	43
Figura 5: Esquema ilustrativo da cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	46
Figura 6: Esquema representativo do delineamento experimental.....	47
Figura 7: Curva de sobrevivência para os grupos sham, sepse e sepse + HDZ avaliados por até 48 h.....	63
Figura 8: Escore clínico de sepse em animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	64
Figura 9: Variação da temperatura dos animais nos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	65
Figura 10: Peso corporal inicial e variação do peso corporal dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ	66
Figura 11: Concentração de glicose no sangue dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	67
Figura 12: Concentração de lactato dos animais dos grupos sham, sepse, Sepse + HDZ.....	68
Figura 13: Pressão arterial média dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	69
Figura 14: Frequência cardíaca dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ	70
Figura 15: Pressão arterial sistólica (A) e diastólica (B) dos animais dos grupos	71

sham, sepse e sepse + HDZ.....	
Figura 16: Efeito da HDZ nas concentrações séricas de TNF- α , IL-1 β e IL-10 dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	72
Figura 17: Efeito da HDZ na atividade da MPO no baço, fígado e rim dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ	73
Figura 18: Efeito da HDZ em espécies reativas ao TBARS no baço, fígado e rim dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	74
Figura 19: Efeito da HDZ na carbonilação de proteínas no baço, fígado e rim dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	75
Figura 20: Efeito da HDZ sobre a sulfidrilção de proteínas no baço, fígado e rim dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	76
Figura 21: Efeito da HDZ na atividade da enzima CAT no baço, fígado e rim dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	77
Figura 22: Efeito da HDZ sobre a atividade da enzima SOD no baço, fígado e rim de animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	78
Figura 23: Efeito da hidralazina sobre a atividade da Akt no baço, fígado e rim dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ.....	79
Figura 24: Possíveis mecanismos de ação da hidralazina e seus efeitos protetores na sepse.....	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Escore clínico de sepse para avaliar a gravidade da doença em modelo murino de sepse experimental.....	37
Quadro 2: Associação entre diagnóstico de hipoperfusão periférica e mortalidade em sepse.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACP – American College of Chest Physicians

AKT – Proteína Cinase B

ALT – Alanina Aminotransferase

APACHE – Fisiologia Aguda e Avaliação Crônica de Saúde

AST – Aspartato Aminotransferase

CAT – Enzima Catalase

CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal

CLP – Ligadura e Perfuração do Ceco

DE – Departamento de Emergência;

ELISA – Ensaio Imunoabsorvente Enzimático

eNOS – NOS isoforma endotelial

EPM – Erro Padrão da Média

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FC – Frequência Cardíaca

FT – Fator Tecidual

HbO₂ – Saturação de Oxigênio-Hemoglobina;

HDZ – Hidralazina

I.M. – Intra Muscular

I.P. – Intra Peritoneal

IFM – Índice de Fluxo Microvascular;

IL-10 – Interleucina 10

IL-1 β – Interleucina 1 beta

ILAS – Instituto Latino Americano de Sepsis

IP – Índice de Perfusão;

LDF – Fluxometria por Laser Doppler;

LPS – Lipopolissacarídeo

MDA – Malondialdeído

MPO – Mieloperoxidase

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NIRS – Espectroscopia no Infravermelho Próximo;

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

OCT – Desafio Transcutâneo de Oxigênio;

OPS – Imagem Espectral por Polarização Ortogonal;

PAM – Pressão Arterial Média

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PAMP's – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PGS – Peptidioglicanos

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PIP2 – Fosfatidilinositol (4,5) -bisfosfato

PIP3 – Fosfatidilinositol (3,4,5) -trisfosfato

PRR's – Receptores de Reconhecimento Padrão

RAFT – Tempo de Enchimento Arterial Retiniano;

RDW – Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (Red Cell Distribution Width)

rSO₂ – Índice Regional de Saturação de Oxigênio;

S.C. – Subcutâneo

SCCM – Society of Critical Care Medicine

SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SOD – Superóxido Dismutase

SOFA – Avaliação Sequencial de Falha de Órgãos

StO₂ – Saturação de Oxigênio Tecidual;

TBARS – Ácido Tiobarbitúrico

TEC – Tempo De Enchimento Capilar;

TLR – Receptor Toll-like

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VLS – Espectroscopia com Luz no Espectro Visível;

VPP – Proporção de Pequenos Vasos Perfundidos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Sepses.....	24
2.2 Epidemiologia da Sepses.....	25
2.3 Fisiopatologia da Sepses.....	26
2.4 Disfunção Orgânica e Sepses.....	28
2.5 Estresse Oxidativo e Sepses.....	31
2.6 Tratamento da Sepses.....	33
2.7 Hidralazina.....	34
2.8 Modelos de Indução da Sepses.....	35
2.9 Gravidade da sepses em modelo animal.....	37
2.10 Biomarcadores Utilizados na Sepses.....	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Revisão Sistemática.....	41
4.1.1 Pergunta norteadora.....	41
4.1.2 Estratégia de busca.....	41
4.1.3 Desfechos.....	41
4.1.4 Extração de dados.....	42
4.1.5 Avaliação de qualidade.....	42
4.2 Realização dos Experimentos <i>in vivo</i>.....	44
4.2.1 Drogas.....	44
4.2.2 População e amostra.....	44
4.2.3 Delineamento experimental.....	44
4.2.4 Protocolo de indução da sepses.....	45
4.2.5 Avaliação da taxa de sobrevivência.....	47
4.2.6 Determinação do escore clínico de gravidade da sepses.....	47
4.2.7 Avaliação da temperatura corpórea.....	48

4.2.8 Peso corpóreo.....	48
4.2.9 Determinação da glicemia.....	48
4.2.10 Determinação do lactato enzimático.....	48
4.2.11 Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos.....	49
4.3 Realização dos Ensaio de Biologia Molecular.....	49
4.3.1 Dosagens de citocinas séricas.....	49
4.3.2 Extração de proteínas do tecido.....	50
4.3.3 Determinação da concentração total de proteínas.....	50
4.3.4 Atividade da mieloperoxidase.....	50
4.3.5 Avaliação do estresse oxidativo.....	50
4.3.5.1 Atividade da enzima catalase (CAT).....	50
4.3.5.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	51
4.3.6 Avaliação dos marcadores de dano oxidativo.....	51
4.3.6.1 Marcador de dano lipídico.....	51
4.3.6.2 Marcadores de danos proteico.....	52
4.3.7 Determinação do imunoconteúdo proteico por western blot.....	53
4.4. Análise Estatística.....	54
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Revisão Sistemática.....	55
5.1.1 Resultados da seleção dos estudos.....	55
5.1.2 Associação entre perfusão periférica, microcirculação e mortalidade na sepse.....	56
5.2 Resposta à Pergunta Norteadora.....	62
5.3 Efeito da HDZ sobre a taxa de sobrevivência e o escore clínico da sepse.....	63
5.4 Efeito da HDZ sobre a variação da temperatura e do peso corporal.....	65
5.5 Efeito da HDZ sobre as concentrações da glicemia e do lactato.....	67
5.6 Efeito da HDZ sobre os Parâmetros Hemodinâmicos.....	69
5.7 Efeito da HDZ nas concentrações séricas de citocinas.....	72
5.8 Efeito da HDZ sobre a atividade da MPO.....	73
5.9 Efeito da HDZ sobre o dano oxidativo.....	74
5.10 Efeito da HDZ na atividade das enzimas CAT e SOD.....	77
5.11 Efeito da HDZ na via de sinalização PI3K/Akt na sepse.....	79

6 DISCUSSÃO.....	80
7 CONCLUSÃO.....	92
7.1 Perspectivas Futuras.....	93
REFERÊNCIAS.....	94
ANEXOS.....	109
Anexo A.....	109
Anexo B.....	110
Anexo C.....	111

1 INTRODUÇÃO

A sepse é caracterizada por uma resposta imunoinflamatória amplificada de forma sistêmica a uma infecção, seja ela causada por bactérias, vírus, fungos ou protozoários. É uma das principais causas de morte em pacientes gravemente enfermos admitidos em unidades de terapia intensiva (UTI) (VALLEJOS et al, 2019; ZARBOCK et al, 2014), e suas taxas de mortalidade permanecem altas em todo o mundo. Anualmente, estima-se que ainda ocorrem 6 milhões de mortes devido à sepse em todo o mundo (COSTA et al, 2019). Dados de estudo epidemiológico sobre sepse em UTI mostraram que a taxa de mortalidade por sepse, sepse grave e choque séptico foi de 19,6%, 34,4% e 65,3%, respectivamente (COSTA et a, 2019). No Brasil, entre janeiro de 2019 e novembro de 2020, as regiões com maiores taxas de mortalidade foram a região Sudeste (48,21%) e a região Nordeste (45,88%) (DATASUS, 2021).

Em 2016, um novo consenso sobre o diagnóstico de sepse em humanos foi lançado pela European Society of Intensive Care Medicine e pela Society of Critical Care Medicine. Onde a sepse deixou de ser considerada uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica de um hospedeiro à infecção, e passou a ser definida como uma infecção suspeita ou documentada, acompanhada de aumento agudo de dois ou mais pontos no Sequential Organ Failure Assessment (SOFA), considerando as disfunções no sistema respiratório, cardiovascular, de coagulação, neurológico, hepático e renal (SINGER et al., 2016). Essa mudança ocorreu após evidências importantes, tanto em ensaios pré-clínico quanto clínico, que demonstraram que a sepse, era mais do que um estado inflamatório, e também envolvia alterações importantes nos níveis metabólico, endócrino e oxidativo (SINGER et al., 2016).

Apesar de inúmeros estudos e grandes avanços no conhecimento científico, a sepse continua sendo responsável por alta mortalidade em pacientes internados em UTI. A terapia da sepse ainda conta com antibioticoterapia e cuidados de suporte, a mesma abordagem que vem sendo utilizada há décadas e, infelizmente, não existe uma terapia específica para o manejo dessa síndrome. A comunidade científica tem buscado novas terapias para o tratamento da sepse, em particular os medicamentos antioxidantes (KUMAR et al., 2018), e, nesse contexto, a hidralazina (HDZ) é um forte candidato. Embora a HDZ seja mais conhecida como uma potente substância

vasodilatadora e tenha sido frequentemente usado nas últimas cinco décadas como anti-hipertensivo, devido a sua segurança e ao baixo risco de causar toxicidade (HERMAN; TIVAKARAN, 2020), estudos têm mostrado que ela também possui potentes propriedades antioxidantes, principalmente em relação à inibição da formação e sequestro de ERO e ERN *in vivo* e *in vitro* (GUO et al., 2019; MEHRABANI et al., 2020). Essa capacidade pode ser devido à presença de ligações NH conjugadas, uma vez que HDZ exhibe excelentes propriedades de eliminação de radicais (BOULEBD et al., 2020).

Os efeitos da HDZ na geração de radicais livres e no aparecimento de apoptose em neurônios e timócitos de ratos velhos vem sendo estudado há décadas e já foi demonstrado que a HDZ diminuiu a apoptose e a geração de radicais livres nessas células (JOHNSON et al., 1998). Daiber et al., (2005) investigaram os efeitos da HDZ na quimiluminescência induzida por superóxido/peroxinitrito, bem como na produção de ERO mitocondrial na exposição à nitroglicerina. Nesse estudo, a HDZ exibiu uma forte capacidade de sequestrador de ERO e inibiu a geração de O₂.

Os mecanismos que estão associados à patogênese da sepse são complexos e envolvem a ativação de vários tipos de células do sistema imunológico e citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e o interleucinas IL-6, IL-1 β e IL-12 (AKIRA et al., 2006). Estudos têm mostrado o envolvimento do estresse oxidativo na sepse humana (OLIVEIRA et al., 2017) e em ratos (NING et al., 2017). Costa et al, (2016) observaram um aumento na produção de óxido nítrico (NO) associado à ativação de vias pró-inflamatórias e uma redução na atividade de enzimas antioxidantes. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são mediadores do estresse oxidativo; o ânion superóxido, uma das três espécies primárias, na presença de NO pode formar peroxinitrito, um potente oxidante que tem efeitos tóxicos em várias biomoléculas e que está envolvido com apoptose celular e disfunção orgânica na sepse (LIAUDET et al., 2013).

No entendimento da sepse, já é demonstrado que a via de sinalização PI3K e Akt apresenta uma forte participação, uma vez que estão envolvidas na regulação da ativação celular, inflamação e apoptose. Na resposta imunológica, a via PI3K/Akt desempenha um papel importante, pois regula a liberação de fatores inflamatórios *in vitro* e *in vivo*, controlando a ativação de moléculas sinalizadoras, e está intimamente

relacionada à ocorrência e ao desenvolvimento de sepse (ZHOU et al., 2018).

Portanto, nossa hipótese é que a HDZ pode melhorar significativamente o desfecho clínico da sepse, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Assim, nesse trabalho nós apresentaremos resultados que possam confirmar essa hipótese, demonstrando que a HDZ é capaz de melhorar a resposta inflamatória, reduzir o estresse oxidativo e a mortalidade induzida pela sepse, bem como apresentar alguns dos possíveis mecanismos de ação envolvidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sepses

A origem da palavra sepses deriva do grego “σηψις”. Significa decomposição ou putrefação de material orgânico na presença de bactérias. A sepses foi primeiramente descrita por Hipócrates, há aproximadamente 2700 anos (SCHULTE et al., 2013).

A sepses pode ser definida como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome) associada a um foco infeccioso suspeito ou confirmado, que pode evoluir para sepses grave, quando associada à disfunção orgânica ou ao choque séptico (SIQUEIRA, 2009; SIQUEIRA, 2011). Esta doença tem sido reconhecida como um problema de saúde pública e um desafio para as organizações de saúde por estar entre as principais causas de morte de pacientes hospitalizados (AL KHALAF, 2015; SINGER et al., 2016).

A sepses acomete pessoas de todas as faixas etárias, gêneros e etnias e, apesar dos avanços tecnológicos e terapêuticos, ainda mostra alta prevalência de mortalidade (MAYR et al., 2014). Segundo o Instituto Latino Americano da Sepses, a síndrome é a principal causa de morte nas unidades de terapia intensiva (UTI) e uma das principais causas de mortalidade hospitalar tardia, chegando a superar as mortalidades provenientes do infarto do miocárdio e do câncer (ILAS, 2014).

Os sinais e sintomas da sepses são comuns a várias outras doenças. Por este motivo, o seu diagnóstico é deficiente e, muitas vezes, acontece tardiamente. Alguns pacientes podem evoluir muito rapidamente para o choque séptico e morte em questão de poucos dias, a depender da gravidade da infecção, assim como da intensidade da resposta inflamatória (LEVER; MACKENZIE, 2007; OPAL et al., 2014).

Os critérios de diagnóstico da sepses levam em consideração, além da presença ou suspeita de uma infecção, alterações clínicas tais como febre ou hipotermia, taquicardia, taquipneia. As principais disfunções orgânicas associadas são alterações do estado mental (prostração ou delirium), disfunção renal, alterações hepáticas, hematológicas, respiratórias (oxigenação) e hipoperfusão tecidual (SINGER et al., 2016).

Também é recomendada a avaliação por exames laboratoriais, os quais

sinalizam o estado inflamatório, tais como presença de leucocitose ou leucopenia, aumento de células polimorfonucleares imaturas ou bastonetes (> 10%) na circulação, e elevações nas concentrações plasmáticas da proteína-C reativa e procalcitonina (DELLINGER et al., 2013).

A sepse pode ainda evoluir para o choque séptico. Que é definido como um subconjunto da sepse em que as anormalidades subjacentes do metabolismo circulatório e celular são profundas o suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade. No choque séptico é possível encontrar um estado de insuficiência circulatória aguda, com uma probabilidade muito maior de morte do que a sepse isolada. Pacientes com choque séptico podem ser identificados com um constructo clínico de sepse com hipotensão persistente, exigindo vasopressores para manter a PAM \geq 65mmHg e tendo um nível de lactato sérico > 2 mmol/L (18mg/dL) apesar da ressuscitação com volume adequado. Com esses critérios, a mortalidade hospitalar é superior a 40% (SINGER et al., 2016).

2.2 Epidemiologia da Sepse

As taxas de mortalidade por sepse permanecem elevadas em todo o mundo, atingindo cerca de 6 milhões a cada ano (COSTA et al., 2019). Em média, a sepse grave contribui com aproximadamente 40% e o choque séptico com cerca de 60% (MAYR et al., 2014). No Brasil, segundo dados do DATASUS, entre junho do ano de 2012 até junho do ano de 2013, ocorreram 86.798 internações de pacientes com sepse na rede hospitalar gerenciada pelo SUS, onde 37.494 desse total de internações foram a óbito. A taxa de mortalidade no período foi de 43,20%, sendo que a região sudeste foi a que concentrou o maior número de casos e, por conseguinte, foi a região com a maior taxa de mortalidade: 48,17%. Essas internações custaram aos cofres do governo aproximadamente 287 milhões de reais, no período (BRASIL, 2013). No Brasil, entre janeiro de 2019 e novembro de 2020, as regiões com maiores taxas de mortalidade foram a região Sudeste (48,21%) e a região Nordeste (45,88%) (DATASUS, 2021).

Infere-se que em todo o mundo, cerca de 20 a 30 milhões de pessoas sejam acometidas todos os anos por sepse (REINHART et al., 2013). De acordo com dados da pesquisa do Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), entre 2005 a 2013 houve

uma mortalidade de 34,8% no Brasil e de 23,9% no mundo entre pacientes acometidos por sepse grave e de 64,5% no Brasil e de 37,4% no mundo entre pacientes com diagnóstico de choque séptico. Dados mais recentes, pertinentes ao ano de 2014, foram apresentados no Relatório Anual do Instituto Latino Americano de Sepse, onde mostraram que o percentual de mortalidade nos hospitais públicos brasileiros subiu para 45,8% em casos de sepse grave, e de 72,5% em casos de choque séptico (ILAS, 2014).

A sepse pode atingir pessoas de qualquer idade, porém a sua ocorrência é maior em idosos e neonatos. A incidência de sepse neonatal é de 1-8/1.000 nascimentos e apresenta taxa de mortalidade de 16%. Em idosos, acima de 85 anos, a incidência é de 26/1000, com mortalidade de 38,4% (ANGUS et al., 2001; STOLL et al., 2011). A sepse no estágio neonatal geralmente ocorre em prematuros, os quais são imunologicamente comprometidos e mais vulneráveis a infecções e suas consequências, o que resulta em pior prognóstico a curto e longo prazo (DOWNIE et al., 2013). Por razão semelhante, os idosos apresentam imunosenescência e altos níveis de proteínas pró-inflamatórias circulantes (MCDONALD et al., 2010).

Além de apresentar alta incidência e letalidade outro problema que envolve a sepse é com relação aos gastos relacionados aos tratamentos e intervenções necessárias aos pacientes acometidos. De acordo com o Instituto Latino - Americano para Estudos da Sepse (2015), o gasto hospitalar com cuidados aos pacientes com sepse grave ou choque séptico foi de U\$ 10.595, apresentando um gasto médio diário de U\$ 1.028. De forma interessante, o custo diário de pacientes não sobreviventes foi notavelmente mais elevado, corroborando a ideia da associação entre gravidade e custos (ILAS, 2015).

2.3 Fisiopatologia da Sepse

A sepse representa uma resposta sistêmica do sistema imunológico a um agente infeccioso, na qual a virulência do patógeno e a resistência do hospedeiro regulam as repercussões da resposta inflamatória (SALOMÃO et al., 2014). Dessa forma, ocorre progressão da sepse quando o hospedeiro não consegue controlar a infecção primária por resistência à opsonização, à fagocitose, a antibióticos e a presença de superantígenos (RUSSEL, 2006).

Na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sepse, as células do sistema imune inato são as primeiras a agir, uma vez que apresentam os receptores de reconhecimento padrão (PRR's), sendo eles os que permitem iniciar uma resposta de defesa após um dano ao tecido ou após uma infecção microbiana, sendo esta última detectada pelos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) que geralmente são expressos por microorganismos ou agentes microbianos (BIANCHI, 2007; NDUKA; PARRILLO, 2011).

Quando esses antígenos são expostos, principalmente a família de receptores TLR (do inglês, Toll-like receptor), que são uma subfamília de PPR's, induzem uma cascata de ativação celular; sendo o TLR4 o receptor mais comumente envolvido na reação séptica frente a exposição de lipopolissacarídeos (LPS) de microrganismos gram negativos, e o TLR2 o receptor mais envolvido com os peptidoglicanos (PGS) dos gram positivos (MIFSUD; JACKSON, 2014).

Depois que ocorre a ligação entre os PAMP's e os TLR's, diversos mecanismos são acionados, um deles é a ativação das quinases I κ K α e I κ K β , as quais formam o dímero I κ K, que por sua vez inibe o I κ B, que é o inibidor da transcrição do Fator nuclear kappa B (NF- κ B), um fator de transcrição que promove a expressão gênica de moléculas pro-inflamatórias (ARCAROLI et al., 2006).

Dentre essas moléculas pró-inflamatórias, na sepse, ocorre a liberação de interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-12, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e o Interferon gama (IFN)- γ e as quimiocinas como a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1/CCL2) e IL-8 na chamada "cascata de citocinas" (AKIRA et al., 2006). Em contrapartida a essa resposta pró-inflamatória, ocorre a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-13 e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β). Essas citocinas possuem a capacidade de inibir a síntese das moléculas inflamatórias e com isso, permitem restaurar o equilíbrio imunológico (SCHULTE et al., 2013).

A ativação de citocinas e/ou quimiocinas faz com que ocorra um descompasso no sistema hemostático orquestrando um quadro de coagulação intravascular disseminada conduzindo em alterações hemodinâmicas com a formação de trombose microvascular e deposição de fibrina, o que pode acarretar na oclusão de vasos

importantes, complicando ainda mais o quadro clínico, devido a hipoperfusão (SAGY et al., 2013).

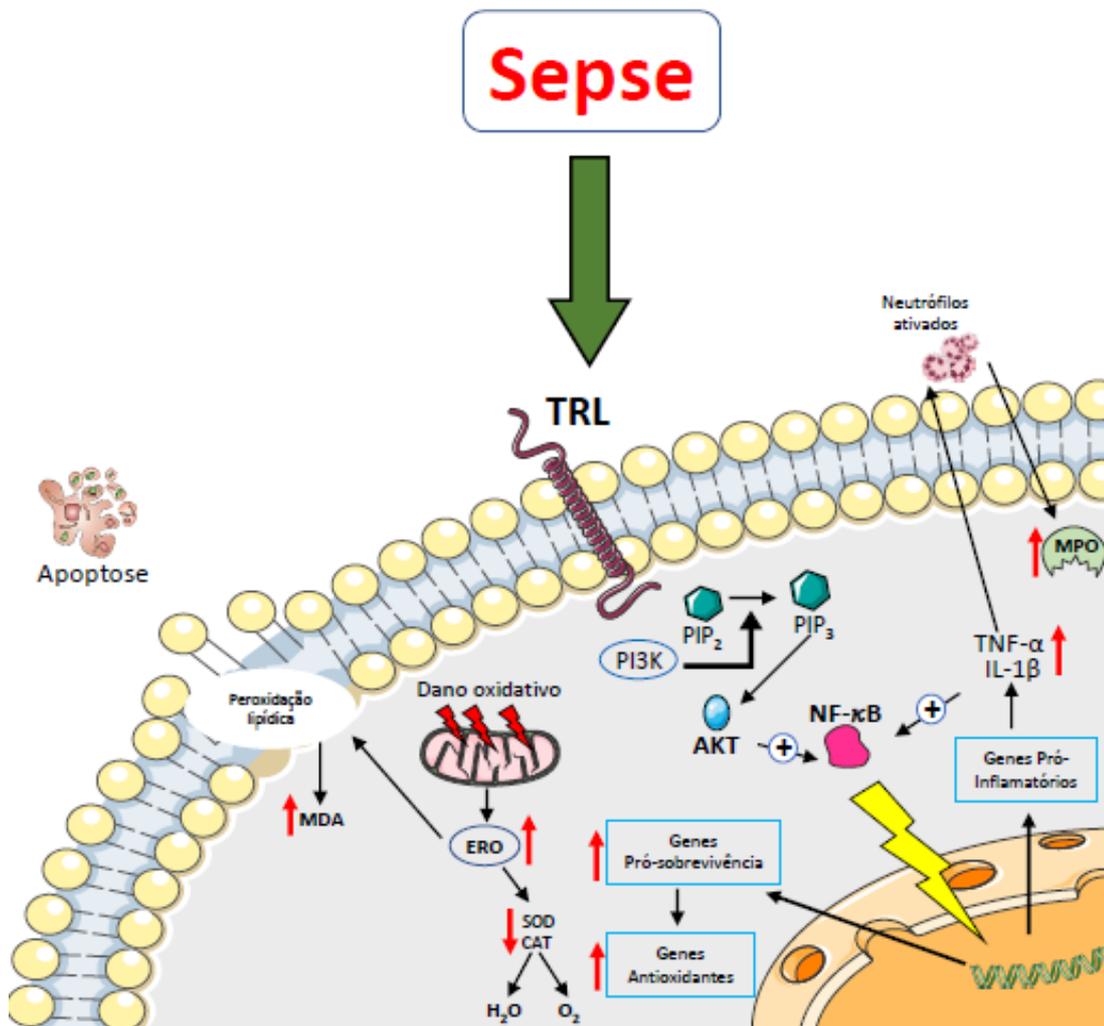


Figura 1: Possíveis vias de sinalização alterada pela sepse. AKT, proteína cinase B; CAT, enzima catalase; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; IL, interleucina; MDA, malondialdeído; MPO, Mieloperoxidase; NF- κ B, fator nuclear kappa B; O_2 , oxigênio; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PIP₂, fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato; PIP₃, fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato; ERO, espécies reativas de oxigênio; SOD, enzima superóxido dismutase; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; TRL, receptor toll-like. Fonte: Elaborada pelo autor.

2.4 Disfunção Orgânica e Sepse

A sepse pode afetar todos os órgãos do corpo, uma vez que diversos tipos de citocinas e outros mediadores são liberados na circulação ao decorrer do desenvolvimento desse quadro (HOTCHKISS et al., 2016). Como visto anteriormente, uma das principais características da fisiopatologia da sepse é a perfusão inadequada dos órgãos, que contribui assim para o desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos e que pode ocorrer por extravasamento de fluido dos vasos, perda do tônus

vascular, depressão miocárdica e por redistribuição microcirculatória do fluxo sanguíneo, dentre outros fatores (SINGER, 2014). Alterações microcirculatórias que se desenvolvem durante a sepse consistem na diminuição da densidade de capilares e em perfusão tecidual heterogênea, fazendo com que o suprimento sanguíneo chegue de forma limitada em diferentes regiões dos órgãos (DE BACKER et al., 2014). Apesar de não serem os únicos sistemas prejudicados na sepse, destacaremos aqui o cardiovascular, o renal e o hepático, por estarem relacionados ao objetivo do trabalho:

Cardiovascular: Uma característica marcante da sepse é a hipotensão arterial. Observa-se também, uma depressão da função miocárdica, mesmo em pacientes que apresentam um débito cardíaco elevado. Essa disfunção miocárdica é consequência de múltiplas alterações celulares, como o efeito das citocinas, do óxido nítrico, das lisozimas 6 e C, do material genético bacterianos, entre outros (ABRAHAM; SINGER, 2007; KAKIHANA et al., 2016). Sendo o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), um dos principais fatores, uma vez que irá relacionar a inflamação com o comprometimento cardiovascular, contribuindo para a queda da pressão arterial pelo aumento nos níveis de NO. De forma geral, dois estágios cardiovasculares distintos são observados, a fase inicial (fase hiperdinâmica), que é caracterizada pela diminuição da resistência vascular periférica, resultado da perda do tônus vasomotor, e tem como consequência a perda do controle da pressão arterial e a perda da regulação da distribuição do débito cardíaco; e a fase tardia (fase hipodinâmica), na qual as alterações hemodinâmicas observadas levam ainda à disfunção microcirculatória com importantes consequências macro hemodinâmicas, como o distúrbio no transporte de oxigênio e na utilização do mesmo pelos tecidos, e a disfunção endotelial com formação de edema e infiltração de células inflamatórias. A resposta pressórica de pacientes sépticos à administração exógena de catecolaminas e outros vasoconstritores está significativamente reduzida, caracterizando o que é chamado de hiporresponsividade a vasoconstritores (ASSREUY, 2006). A disfunção cardiovascular que ocorre durante a sepse influencia na função renal.

Renal: o comprometimento renal na sepse pode progredir para uma falência renal aguda. Apesar dos exatos mecanismos não serem esclarecidos, parte da disfunção renal se dá pela perda do volume intravascular induzida pelo aumento da

permeabilidade e pela vasodilatação (GLODOWSKI et al., 2015). Na vigência de choque cardiogênico, a vasoconstrição renal associada à hipovolemia compromete a oxigenação tecidual. Dessa forma, os quadros de isquemia induzem a lesões das células do epitélio tubular, à apoptose e a necrose tubular aguda, em caso de hipoperfusão prolongada (PIRES et al., 2020). Além disso, aumentos nas concentrações séricas de creatinina são associados com maior mortalidade (RICCI et al., 2011). A lesão renal aguda é uma disfunção frequente na sepse e a sepse é também a causa mais frequente de LRA. Essa associação é mais comum em pacientes idosos. A LRA séptica apresenta uma mortalidade intra-hospitalar que pode variar de 30 a 70% (GLODOWSKI et al., 2015). Outra explicação para a ocorrência da disfunção renal é a resposta inflamatória da sepse. As células mesangiais e tubulares são capazes de expressar citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e o TNF- α , que estimulam a uma maior liberação de citocinas e a expressão do Fator Tecidual (FT), promovendo trombose local, induzindo apoptose celular tubular e aumentando o estresse oxidativo regional, com produção de ERO, que contribuem para progressão da lesão e falência do órgão (KELLUM e PROWLE, 2018).

Hepático: O tecido hepático possui papel fundamental na sepse, participando da defesa do organismo, no equilíbrio anti-inflamatório e pró-inflamatório, na reparação tecidual e na coagulação (CHUNG et al., 2017). Alterações nesse órgão, durante a sepse, também são comuns, apresentando aumento nos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total e fosfatase alcalina. Durante a sepse, a infecção e a resposta inflamatória exacerbada causam uma má perfusão tecidual e são responsáveis pelo dano hepático. As lesões no fígado durante a sepse incluem inflamação portal, necrose centrilobular, inflamação lobular, apoptose dos hepatócitos e esteatose (YAN, LI & LI, 2014).

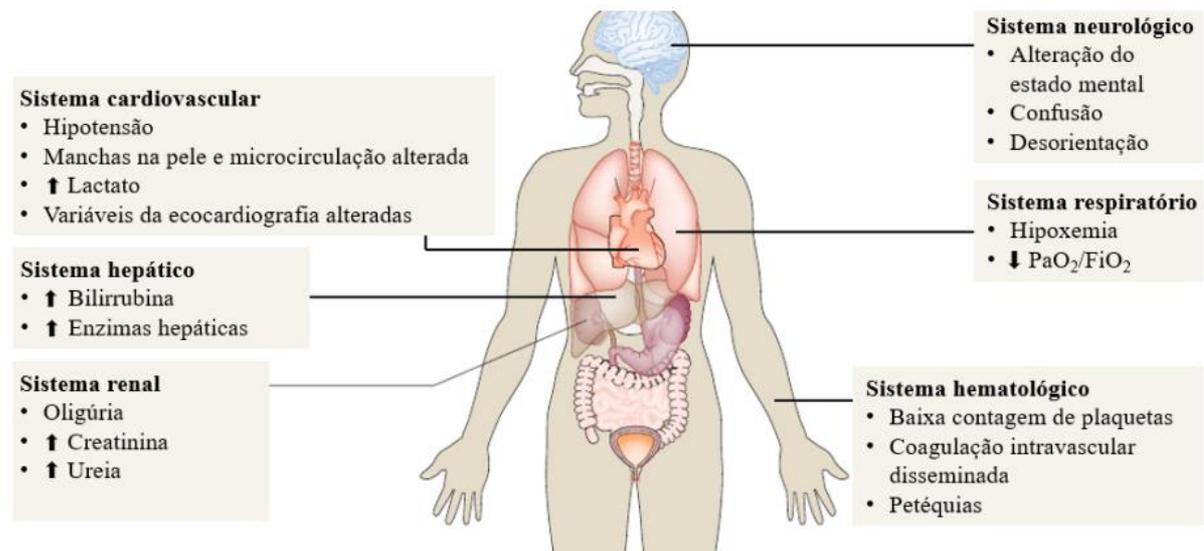


Figura 2: Sistemas acometidos pela sepse. A sepse pode levar à disfunção de diversos órgãos em nosso corpo. Os sistemas acima mencionados são fortemente prejudicados durante a sepse, fazendo com que o paciente apresente sinais e sintomas que são detectados e monitorados na prática clínica. Fonte: Lelubre & Vincent (2018), adaptado.

2. 5 Estresse oxidativo e Sepse

Em nosso organismo, nas condições fisiológicas normais, ocorre uma baixa produção de radicais livres. Sua produção é inevitável, pois são necessários para o processo de respiração celular que acontece nas mitocôndrias (CASTROGIOVANNI; IMBESI, 2012; SILVA, 2014). Dessa forma, a produção endógena é obtida a partir da cadeia transportadora de elétron na mitocôndria por meio da redução do O₂, que é reduzido pelo citocromo c oxidase à duas moléculas de H₂O e o NADH é oxidado a NAD⁺, para que haja a produção de ATP. Na redução do O₂ são gerados os radicais superóxido (O₂ •), hidroxila (OH•) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre (CASTROGIOVANNI; IMBESI, 2012; SILVA, 2014).

A produção das ERO apresenta também uma importância, pois sua produção, em quantidades equilibradas, é essencial para a manutenção da homeostase. Embora apresentem potencial tóxico ao metabolismo, a produção das ERO torna-se desejável em algumas situações. Sabe-se que durante a ativação máxima de neutrófilos e monócitos na fase inflamatória, diversas espécies, como NO₂, H₂O₂ são produzidas e armazenadas com o objetivo de auxiliarem posteriormente na destruição de antígenos não próprios (ALMEIDA, 2013). Apesar disso, uma boa defesa fisiológica

por parte dos antioxidantes deve ser modulada para impedir a amplificação dessas reações e gerar o estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2010).

A mitocôndria é o principal local de formação de EROs, pois grande parte da energia produzida é gerada por meio da fosforilação oxidativa, o que implica nos complexos enzimáticos. Sendo assim, paradoxalmente, o processo natural para o desenvolvimento da vida, também é um dos principais responsáveis pela formação das EROs, já que essas espécies são produzidas por reações REDOX, como é o caso da NADPH, que atua no mecanismo de defesa intracelular (TONIOLLI; COSTA, 2017).

Desta forma, o estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e as defesas antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo. A membrana celular é um dos componentes mais atingidos pelas ERO/ERN e possui elevada susceptibilidade à peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando na morte celular (TATARANNO et al., 2015). Além disso, as proteínas celulares também sofrem reações oxidativas, que levam a alterações nas suas estruturas e funções (WANG et al., 2016). E, por fim, o dano pode ainda propagar-se até o núcleo celular, danificando o DNA e dificultando os mecanismos de reparação (MILEO e MICCADEI, 2016).

Como defesa antioxidante, as enzimas operam como um sistema coordenado, balanceado, e atuam juntamente com outros antioxidantes não-enzimáticos (vitaminas A, E e C, betacaroteno, etc.) a fim de proteger nosso organismo contra a injúria celular causada pelas ERO e ERN. Este complexo de sistema antioxidante enzimático é constituído pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) (LUBRANO e BALZAN, 2015).

Quando ocorre um desequilíbrio na homeostasia do organismo e a instalação da sepse, há uma superprodução de ERO, devido a atividade celular. Esse aumento exige do organismo um aumento na atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx plasmáticas e teciduais, na tentativa de combater o dano oxidativo. No entanto, essas defesas antioxidantes não conseguem neutralizar a grande quantidade de ERO que são produzidas durante a sepse, além de apresentarem uma redução no decorrer

do agravo promovido pela patologia. Esse desequilíbrio estabelece um quadro de estresse oxidativo, que pode ocasionar dano oxidativo tecidual, observado por meio do dano celular aos seus componentes lipídicos (lipoperoxidação), proteínas (carbonilação proteica) ou dano ao DNA (PETRONILHO et al., 2016), que possuem papel primordial no processo patológico, o qual, por sua vez, leva à disfunção nos diferentes órgãos acometidos na sepse (BAI et al., 2015).

2.6 Tratamento da Sepse

O tratamento da sepse é guiado por diretrizes que visam fornecer orientações para o cuidado clínico de pacientes com sepse grave ou choque séptico. Os princípios utilizados inicialmente são o de proporcionar reanimação cardiorrespiratória, prover suporte clínico e controlar as ameaças imediatas de infecção descontrolada. A ressuscitação com fluidos intravenosos para a reposição volêmica, a administração de vasopressores, associados à terapia de suporte de oxigênio e ventilação mecânica, são fornecidos conforme necessidade do paciente (ANGUS; VAN DER POLL, 2013).

Para o suporte hemodinâmico e tratamento do choque séptico (DELLINGER et al, 2013), recomenda-se que a hipotensão deve ser gerenciada inicialmente com reposição volêmica, 30 ml/Kg em bólus de terapia intravenosa com cristaloides como fluido inicial, para manter a pressão arterial média (PAM) maior ou igual a 65 mmHg, Caso a PAM não seja reestabelecida com a ressuscitação com fluidos, a terapia vasopressora deve ser implementada.

Apesar de a reposição volêmica precoce ser iniciada por meio da expansão intravascular por meio de soluções cristaloides ou coloides, o uso de drogas vasoativas e inotrópicas pode ser necessário (LOPES et al., 2010). Mais recentemente, um estudo retrospectivo (BAI et al., 2014) identificou uma forte associação entre o início precoce da terapia vasopressora e redução da mortalidade nesses pacientes.

Atualmente, estudos têm demonstrado a implementação de substâncias vasodilatadoras para tratar os pacientes portadores de sepse. Como exemplo, podemos citar o trabalho realizado por Pugin, 2014, onde fora testado a adrenomodulina como um vasodilatador para o tratamento de sepse e o mesmo destaca que esse tratamento oferece esperança para restaurar a estabilidade

endotelial.

2.7 Hidralazina

Dentre as drogas com efeito vasodilatador, está a HDZ, que é um potente vasodilatador, e apresenta efeito rápido. O uso desta droga pode ser considerado em situação de emergência, pois com a administração parenteral, a resposta pode ser demonstrada com cerca de 15 minutos da sua administração (SYME, 2010). E seu efeito máximo dura em torno de 3-5 h e atua diretamente nas arteríolas, resultando em diminuição da resistência vascular sistêmica e redução da pressão arterial (MUCHA, 2009).

A HDZ foi introduzida pela primeira vez como um agente anti-hipertensivo em 1952 (TIMLIN et al., 2019). Ainda é prescrito por via oral como agente terapêutico para tratar hipertensão essencial e por via intravenosa para baixar a pressão arterial em situações de urgência (HERMAN; TIVAKARAN, 2020) devido à sua eficácia e segurança (ZEISBERG; ZEISBERG, 2016). Essa substância foi reutilizada na década de 1980 para o tratamento da insuficiência cardíaca e na década de 2000 para a terapia do câncer epigenético (BURCHAM, 2018). Também há relatos sobre os benefícios anti-envelhecimento da HDZ (SNELL et al., 2016; ZEISBERG; ZEISBERG, 2016), bem como em estudos neurológicos, causando uma melhora nos distúrbios comportamentais (GUO et al., 2019). Apesar dos numerosos estudos, o mecanismo de ação fundamental da HDZ é pouco compreendido.

Os mecanismos com o qual a hidralazina promove essa ação ainda não estão muito bem esclarecidos, mas sabe-se que incluem a inibição da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático pelo inositol trifosfato (IP3) e a inibição da fosforilação da miosina, impedindo a contração da musculatura lisa vascular e, conseqüentemente, levando à vasodilatação (FLYNN et al., 2016; MCCOMB et al., 2016). Um outro possível mecanismo de ação da HDZ, seria através dos canais de potássio. Em um estudo realizado por Bang et al., (1998), os autores relatam que a vasodilatação induzida por HDZ envolve a abertura de canais de K^+ ativados por Ca_2^+ de alta condutância.

A HDZ tem demonstrado importante papel no tratamento de doenças cardíacas. Estudos realizados anteriormente têm demonstrado que sua utilização

auxilia para melhorar circulações regionais e em particular o fluxo sanguíneo mesentérico (LOUFRANI; HENRION, 2005; SCHMIDT et al., 2006). Em um trabalho realizado por Dumont et al, (2008), os autores destacam que sua utilização, em doses baixas, proporciona a dupla vantagem de melhorar o fluxo sanguíneo sem influenciar significativamente na PA. Relatam ainda que altas doses de HDZ podem induzir uma redução tanto da PA quanto do fluxo sanguíneo.

A HDZ tem sido muito utilizada nas últimas cinco décadas como anti-hipertensivo. (HERMAN; TIVAKARAN, 2020). No entanto, estudos demonstraram suas potentes propriedades antioxidantes, principalmente para inibir a formação de peroxinitrito e capturar ERO/ERN in vivo e in vitro (CHIRKOV et al., 2010; DAIBER et al., 2005; GUO et al., 2019; MEHRABANI et al., 2020). Este achado parece ser importante, pois na sepse há uma grande formação destas ERO. Um estudo recente relatou benefícios anti-envelhecimento da HDZ por ativar PKA, sirtuínas e NRF2, conhecidos por ter profundo impacto na função mitocondrial e na homeostase antioxidante (DEHGHAN et al., 2019). Devido à presença de ligações NH conjugadas, HDZ exhibe excelentes propriedades de eliminação de radicais (BOULEBD et al., 2020) (Figura 3).



Figure 3: Estrutura molecular da hidralazina.

2.7 Modelos de Indução da Sepses

Diversos modelos animais tem sido utilizados para estudar a fisiopatologia da sepse com o intuito de representar a complexidade clínica encontrada na sepse em

humanos. Os dois modelos mais frequentemente utilizados nos experimentos para indução de sepse são ligadura e perfuração do ceco (CLP) e a administração de LPS (ZANOTTI-CAVAZZONI; GOLDFARB, 2009). O modelo CLP em roedores tornou-se o modelo mais utilizado para sepse experimental e é considerada como o padrão ouro na pesquisa em sepse (RITTIRSCH et al., 2009).

Desenvolvido há cerca de 40 anos, o modelo CLP é considerado um modelo realista para a indução de sepse polimicrobiana em ambientes experimentais para estudar os mecanismos inflamatórios e moleculares envolvidos na sepse (WICHTERMAN et al., 1980). Resumidamente, o CLP apresenta ligadura abaixo da válvula ileocecal após laparotomia mediana, seguida por punção do ceco com agulha. Como o ceco é uma fonte endógena de contaminação bacteriana, a perfuração do ceco resulta em peritonite bacteriana, que é seguida pela translocação de bactérias entéricas mistas para o compartimento do sangue. No início da sepse, a bacteremia desencadeia a ativação sistêmica da resposta inflamatória, subsequente choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos e, finalmente, morte. Quando o modelo CLP é usado em roedores, eles apresentam padrões de doença com sintomas típicos de sepse ou choque séptico, como hipotermia, taquicardia e taquipneia (RITTIRSCH et al., 2009).

Apesar de sua importância na clínica e amplo uso na pesquisa em sepse, uma das principais preocupações do modelo CLP é a diversidade. Antigamente, várias versões do modelo foram utilizadas, sendo que algumas delas diferem substancialmente de sua descrição original em 1979 (HUBBARD et al., 2005). Uma das vantagens do modelo CLP é que ele pode ser adaptado para induzir sepse com uma faixa de gravidade para investigação de sepse aguda e crônica (XIAO et al., 2006). No entanto, essa característica é também seu grande ponto fraco, pois é importante que este modelo seja utilizado com alta consistência para obter resultados confiáveis e reprodutíveis. Com base nas características do próprio modelo, o resultado após o CLP está intimamente associado a vários fatores durante o procedimento. Como por exemplo, o comprimento da ligação do ceco, que é um dos principais determinantes da mortalidade, assim como o tamanho da agulha utilizada para a punção e o número de punções (RITTIRSCH et al., 2009).

2.9 Gravidade da Sepse em Modelo Animal

Uma das maiores dificuldades encontrada no estudo de animais com sepse era determinar a sua gravidade. Sem isso, não tinha como avaliar clinicamente quais os efeitos dos diversos tratamentos sobre a gravidade da doença. Por conta disso, pesquisadores se debruçaram para encontrar um método mais adequado para determinação da gravidade desta doença em um modelo murino de sepse. Assim, Shrum et al, (2014) desenvolveu um método que avalia e pontua sete variáveis clínicas na sepse (Quadro 1).

As variáveis finais que foram incorporadas no escore clínico de sepse incluíram aparência (ou seja, grau de piloereção apresentado pelo animal), nível de consciência, atividade espontânea, resposta ao toque e estímulos auditivos, aparência dos olhos, frequência e qualidade respiratória (respiração difícil ou ofegante). Cada uma dessas variáveis recebe uma escore entre 0 e 4 que serve para avaliar a gravidade do modelo da sepse (SHRUM et al., 2014).

Quadro 1: Escore clínico para avaliar a gravidade da sepse em modelo murino.

VARIÁVEL	ESCORE E DESCRIÇÃO
Aparência	0 – Pele macia (lisa). 1 – Partes do pelo com piloereção. 2 – Maioria das costas com piloereção. 3 – Pode ou não apresentar piloereção, rato parece inchado. 4 – Pode ou não apresentar piloereção, rato parece “desnutrido”.
Nível de consciência	0 – O rato está ativo. 1 – O rato está ativo, mas evita ficar de pé. 2 – A atividade do rato é visivelmente diminuída. O rato ainda está ambulante. 3 – A atividade é prejudicada. O rato só se move quando provocado, movimentos com tremor. 4 – Atividade gravemente prejudicada. O rato permanece estacionário quando provocado, com possível tremor.
Atividade	0 – Quantidade normal de atividade: comer, beber, escalar, correr, lutar. 1 – Atividade levemente suprimida. O rato se move no fundo da gaiola. 2 – Atividade suprimida. O rato está parado com movimentos investigativos ocasionais. 3 – Não há atividade. O rato está parado. 4 – Nenhuma atividade. Rato com tremores, particularmente nas pernas traseiras.
Resposta ao estímulo	0 – O rato responde imediatamente ao estímulo auditivo ou ao toque. 1 – Lento ou nenhuma resposta ao estímulo auditivo; Resposta forte ao toque (move para escapar).

VARIÁVEL	ESCORE E DESCRIÇÃO
	2 – Nenhuma resposta ao estímulo auditivo; resposta moderada ao toque (move alguns passos). 3 – Nenhuma resposta ao estímulo auditivo; resposta suave ao toque (sem locomoção). 4 – Nenhuma resposta ao estímulo auditivo. Pouca ou nenhuma resposta ao toque. Não pode se endireitar se for empurrado.
Olhos	0 – Abertos. 1 – Olhos não totalmente abertos, possivelmente com secreções. 2 – Olhos pelo menos meio fechados, possivelmente com secreções. 3 – Olhos meio fechados ou mais, possivelmente com secreções. 4 – Olhos fechados ou leitosos.
Taxa de respiração	0 – Respiração normal e rápida do rato. 1 – Respiração ligeiramente diminuída (taxa não quantificável por olho). 2 – Respiração moderadamente reduzida (taxa na faixa superior de quantificação por olho). 3 – Respiração severamente reduzida (taxa facilmente contabilizável por olho, 0,5 s entre respirações). 4 – Respiração extremamente reduzida (> 1 s entre respirações).
Qualidade de respiração	0 – Normal. 1 – Breves períodos de respiração forçada. 2 – Forçada. 3 – Forçada com suspiros intermitentes. 4 – Ofegante (suspiros).

Fonte: Traduzido de SHRUM et al. BMC Res Notes,7:233, 2014.

2.10 Biomarcadores Utilizados na Sepses

Além da utilização de um escore clínico para avaliar a gravidade da sepsis, existem diversos marcadores que auxiliam no acompanhamento e evolução do quadro da sepsis. São os biomarcadores que podem ser medidos e avaliados como indicadores da função normal ou patológica do organismo ou de uma resposta a um agente farmacológico (INGRAM, 2013). Devido à relativa facilidade de obtenção, a partir de fluidos biológicos, os marcadores bioquímicos são possivelmente os que apresentam uma maior relevância na prática clínica e na investigação médica (FARINHA, 2019).

Existem vários tipos de biomarcadores: histológicos (amostras de tecido obtidas por biópsias), anatômicos, físicos (modificações características em estruturas biológicas), fisiológicos (funções de órgãos) e bioquímicos (lactato, amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW), leucograma, etc.). Os biomarcadores podem ser hormônios, enzimas, genes, moléculas, células específicas, um parâmetro

químico, físico ou biológico, e não servem apenas para diagnosticar ou avaliar a progressão da doença, mas servem também para acompanhar a evolução do paciente e se o tratamento está sendo eficaz.

Os diversos biomarcadores que já foram estudados para o diagnóstico precoce da sepse, podem ser divididos em biomarcadores para predição do risco, biomarcadores para diagnóstico, para monitoramento e para desfecho (LORANDOSILLA et al., 2018). Nesse grupo de moléculas, podemos destacar o sucesso de algumas, como a procalcitonina e o CD14 (NOBRE e BORGES, 2016), mas elas apresentam elevado custo e não são compatíveis com a realidade de países de baixa e média renda, como o Brasil.

A hemocultura é considerada o melhor no diagnóstico da sepse. No entanto, sua positividade é variável e os resultados não são disponibilizados rapidamente para definição de uma conduta terapêutica adequada. Por esse motivo, proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa (PCR) e a procalcitonina (PCT), são empregadas para o diagnóstico precoce da sepse. Além disso, ainda podemos citar outros marcadores moleculares como as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10), fator de necrose tumoral (TNF) e fatores estimuladores de colônias (G-CSF, M-CSF, GM-CSF). Recentemente, novos marcadores estão sendo investigados, principalmente a amiloide sérica A (SAA), o receptor CD64 de neutrófilo e a interleucina β (IL- β). Todos esses marcadores biológicos, quando associados à avaliação clínica, aumentam as chances de acerto diagnóstico e trazem mais segurança para o início precoce do tratamento e melhora o prognóstico dos pacientes (MACHADO et al., 2017).

Sabe-se que a sepse apresenta altas taxas de mortalidade e morbidade. Desta forma, torna-se justificável e relevante a realização desta pesquisa considerando que a terapêutica atual utilizada não é suficiente para reduzir essas taxas de mortalidade. Estudos com novas substâncias, como por exemplo a hidralazina, que, devido às suas propriedades, apresenta efeitos benéficos na melhoria da resposta inflamatória e do estresse oxidativo podem fornecer informações relevantes para a elucidação de tal impacto na sepse. Um outro ponto importante a ser destacado é o custo – benefício da utilização dessa substância, uma vez que a mesma apresenta valor de mercado acessível.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da HDZ na melhoria da sobrevivência, na resposta inflamatória, no estresse oxidativo induzida pela sepse em um modelo animal, bem como investigar os possíveis mecanismos envolvidos.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar uma revisão sistemática sobre a associação entre a má perfusão avaliada nos tecidos periféricos e a mortalidade na sepse;
- ✓ Avaliar os efeitos da HDZ sobre o tratamento da sepse:
 - A taxa de sobrevivência e severidade da sepse em modelo animal;
 - Temperatura e massa corpórea;
 - Níveis de glicemia e lactato em amostras de sangue;
 - Parâmetros hemodinâmicos como a pressão arterial média, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e a frequência cardíaca;
 - A resposta inflamatória produzida pela sepse;
 - O estresse oxidativo produzido pela sepse através da mensuração de marcadores de dano oxidativo e das defesas antioxidantes em tecidos;
- ✓ Investigar a participação da via de sinalização PI3K/Akt nos efeitos da HDZ sobre a sepse.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse capítulo será dividido em duas partes. Primeiro será apresentado o material e métodos referentes à revisão sistemática. E, em seguida, o material e métodos referentes ao estudo experimental.

4.1 Revisão Sistemática

4.1.1 Pergunta norteadora

Há correlação entre o índice de perfusão periférica e a mortalidade na sepse?

4.1.2 Estratégia de busca

Os itens contidos no Prisma que orientam a descrição de revisões sistemáticas e metanálises foram usados. A pesquisa eletrônica foi feita nas bases de dados Cochrane Central Register of Controlled Trials (Central), Medline, Embase, Scopus e Web of Science até fevereiro de 2018 para identificar estudos relevantes. Na estratégia de busca, não foram usados filtros que limitassem a data de publicação, o idioma e o tipo do artigo. Não foi usado um limite de tempo para a data inicial da pesquisa. Embora isso pareça dificultar a pesquisa por aumentar o tempo, o objetivo era justamente tornar a pesquisa a mais ampla possível. Os desenhos dos estudos não foram restritos porque, embora as “avaliações do risco de mortalidade” sejam classicamente estudadas em “estudos observacionais” (prospectivos ou retrospectivos), essa seleção foi feita na triagem manual por cada um dos autores. A estratégia de busca estruturada foi projetada para identificar qualquer documento publicado que avaliasse a perfusão periférica (com qualquer método) e a mortalidade em pacientes com sepse, ou qualquer informação sobre essas palavras, com o objetivo de tornar a revisão a mais abrangente possível. A estratégia de busca incluiu palavras-chave (descritores) e títulos de assuntos médicos para sepse, microcirculação, mortalidade e perfusão periférica.

4.1.3 Desfechos

O desfecho primário foi avaliar a associação entre má perfusão tecidual periférica e mortalidade na sepse. Inicialmente, os títulos relacionados ao assunto foram selecionados. Essa seleção foi baseada nos títulos que abordaram como ideia principal o índice de perfusão periférica e a taxa de mortalidade em pacientes com

sepsis. No fim dessa etapa, todos os títulos duplicados foram excluídos. Os artigos identificados pela estratégia de busca inicial foram avaliados em conjunto por dois autores. Nos casos em que não houve consenso, uma revisão independente foi feita. Os artigos foram selecionados de acordo com os seguintes critérios de inclusão: estudos que avaliaram a correlação entre o índice de perfusão periférica e a mortalidade em pacientes com sepsis. Os critérios de exclusão foram artigos de revisão, estudos com animais, estudos pré-clínicos, metanálises, resumos, anais de congressos, editoriais, cartas, relatos de casos, estudos duplicados e artigos que não apresentavam resumos e/ou não tinham texto. Subsequentemente, dois autores revisaram em conjunto os resumos dos artigos selecionados para confirmar a relevância para o estudo. Quando o título e o resumo não forneciam informações suficientes, o artigo era lido na íntegra, impediu-se assim que estudos importantes fossem deixados fora desta revisão sistemática.

4.1.4 Extração de dados

Os dados foram extraídos por um revisor e verificados por outro. As informações a seguir foram extraídas de todos os estudos: primeiro autor, ano de publicação e país, metodologia, resultados, fonte de sepsis e escores dos índices relacionados à gravidade, tais como o que avalia a gravidade da doença crônica e aguda com base na fisiologia (Physiology and Chronic Health Evaluation – Apache), o que faz uma avaliação sequencial da falência de órgãos (Sequential Organ Failure Assessment – SOFA), além de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), perfusão periférica, saturação de oxigênio e mortalidade por sepsis. A estratégia de busca é apresentada na figura 4.

4.1.5 Avaliação da qualidade

Para avaliar a qualidade dos estudos incluídos, a versão original (para estudos de caso-controle e de coorte) e uma versão modificada (para estudos transversais) da escala de Newcastle-Ottawa (Newcastle-Ottawa Scale – NOS) foram usadas. As análises foram feitas por dois pesquisadores de forma independente. Os critérios da NOS receberam escores com base em três aspectos: (i) seleção, (ii) comparabilidade e (iii) exposição ou resultado. Os escores totais da NOS variam de 0 (mais baixo) a 9 (mais alto) para estudos de caso-controle e de coorte e de 0 a 10 para estudos

transversais. Aqueles que obtiveram escores acima da mediana foram classificados como estudos de alta qualidade: cinco para estudos de caso-controle e de coorte e seis para estudos transversais. Qualquer discrepância entre os dois pesquisadores nos escores NOS dos estudos inscritos foi resolvida por discussão ou consulta a um terceiro pesquisador.

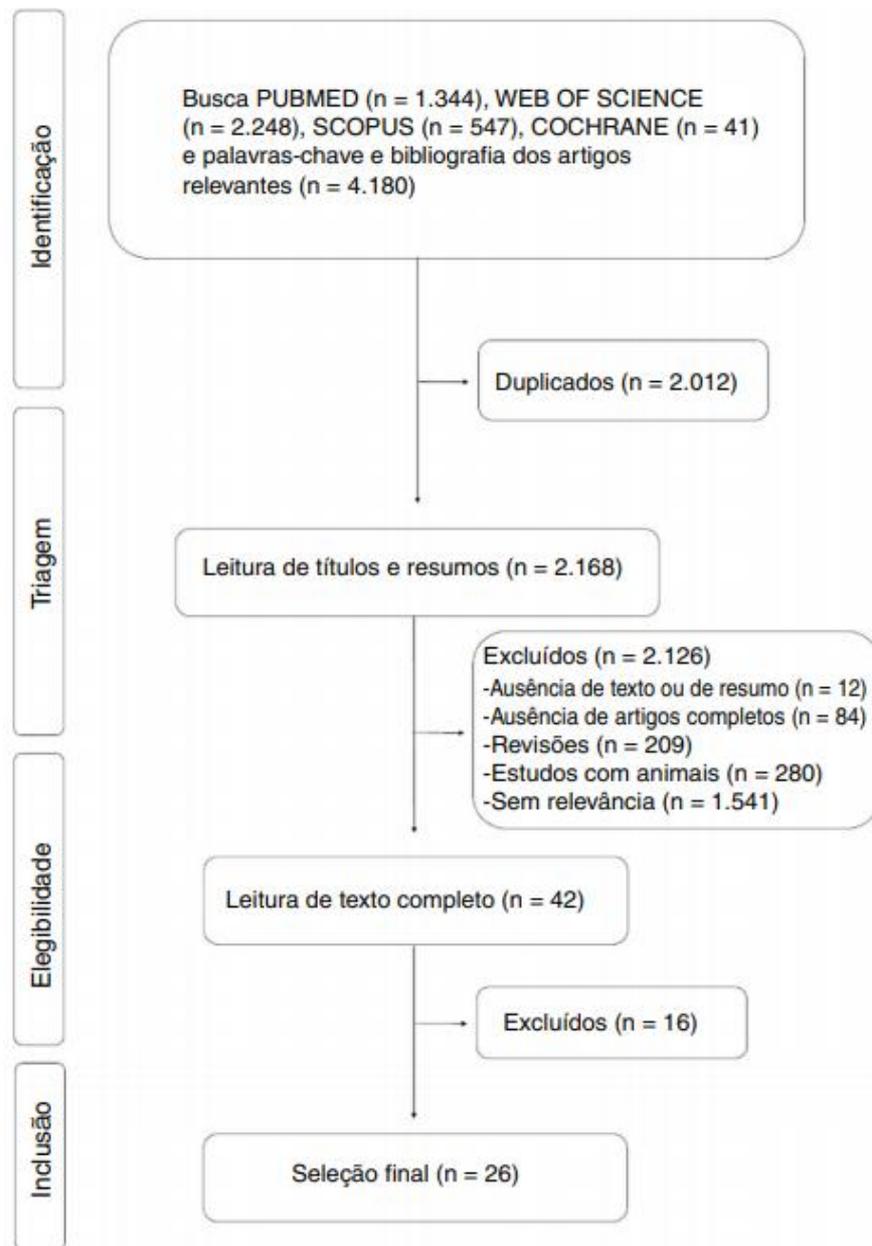


Figura 4: Fluxograma dos artigos incluídos. Os artigos que não estavam relacionados a estudos primários de prognóstico foram excluídos de acordo com os seguintes critérios de exclusão: estudos duplicados, artigos sem resumos e/ou sem texto, artigos não mostrados na íntegra (resumos, relatórios de conferências, postagens de conferências, editoriais, cartas, relatos de casos), revisões ou metanálises, estudos em animais ou pré-clínicos, e cujos sujeitos não atendiam aos critérios deste estudo. (Fonte: SANTOS et al., 2019).

4.2 Realização dos Experimentos *in vivo*

4.2.1 Drogas

Durante a execução dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: Hidralazina (Nepresol®, Cristália, São Paulo/Brasil), Dipirona Sódica (Ibasa, Porto Alegre/Brasil), Cetamina e Xilazina (Ambos da Sespo, Jacareí/Brasil), Heparina (Roche, Rio de Janeiro/Brasil) e Isoflurano (BioChimico, Itatiaia/Brasil). Os demais reagentes foram adquiridos pela Sigma (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, França).

4.2.2 População e amostra

A população foi composta por 40 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) saudáveis com três meses de vida e pesando entre 250 e 300 g provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. Após a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Animal desta Universidade (CEPA/UFS), esses animais foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacológicos (LAFAC/LANEF/DFS/UFS) para a realização dos protocolos experimentais. Os animais foram acomodados em gaiolas de polietileno (41x34x16 cm), com maravalha, contendo 04 animais por caixa, com livre acesso a água filtrada e com ração específica para roedores da marca Nuvilab® "ad libitum", em um ciclo de claro/escuro de 12 h (12 h/12 h noite/dia; luzes acesas das 6 h às 18 h) e temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) durante todo o experimento. Todos os procedimentos experimentais constavam no Guia do Conselho Nacional de Experimentação Animal e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade, sob o número 20/2017 e o protocolo nº 4923121119; ID 000193/2020 (Anexo A).

4.2.3 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 03 grupos com 10 animais cada, pareados por peso corporal, mas distribuídos aleatoriamente pelo CLP:

- ✓ **Grupo Sham** – animais saudáveis submetidos à cirurgia simulada;
- ✓ **Grupo Sepsis** – animais com sepsis;

- ✓ **Grupo Sepsis + HDZ** - animais com sepsis tratados com HDZ na dose de 1 mg/kg (s.c.).

Os animais de todos os grupos foram monitorados nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 h após a realização dos procedimentos cirúrgicos. Decorrido o tempo final de avaliação, os animais foram eutanasiados por dose excessiva da associação de cetamina com xilazina (i.p. 270 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente).

4.2.4 Protocolo de indução da sepsis

A sepsis foi induzida pelo método de CLP. A cirurgia foi realizada 24 h após o procedimento realizado no item 4.2.11 e, seguindo a metodologia descrita por Rittirsch et al (2009) com algumas modificações. Os animais foram anestesiados com isoflurano 4-5% para indução e 1,5-3% para manutenção da sedação e, após a confirmação da ausência de reações a estímulos externos de pinçamentos das patas e cauda, eles foram tricotomizados na região abdominal com o auxílio de uma máquina de depilação. Após a localização da linha alba, foi realizada laparotomia de 2 cm e, com auxílio de material cirúrgico, o ceco e a válvula ileocecal foram localizados e retirados da cavidade abdominal. Feito isso, foi realizada uma obstrução parcial (75%) do ceco, abaixo da válvula ileocecal, onde foi puncionada duas vezes com agulha 18 G (perfuração transfixante) e pressionada para garantir a saída do conteúdo cecal pelos orifícios. Em seguida, o ceco foi recolocado na cavidade e as paredes abdominais suturadas (Figura 5). Os ratos do grupo sham foram submetidos a um procedimento cirúrgico semelhante com exposição cecal, mas sem a ligadura e sem a perfuração.

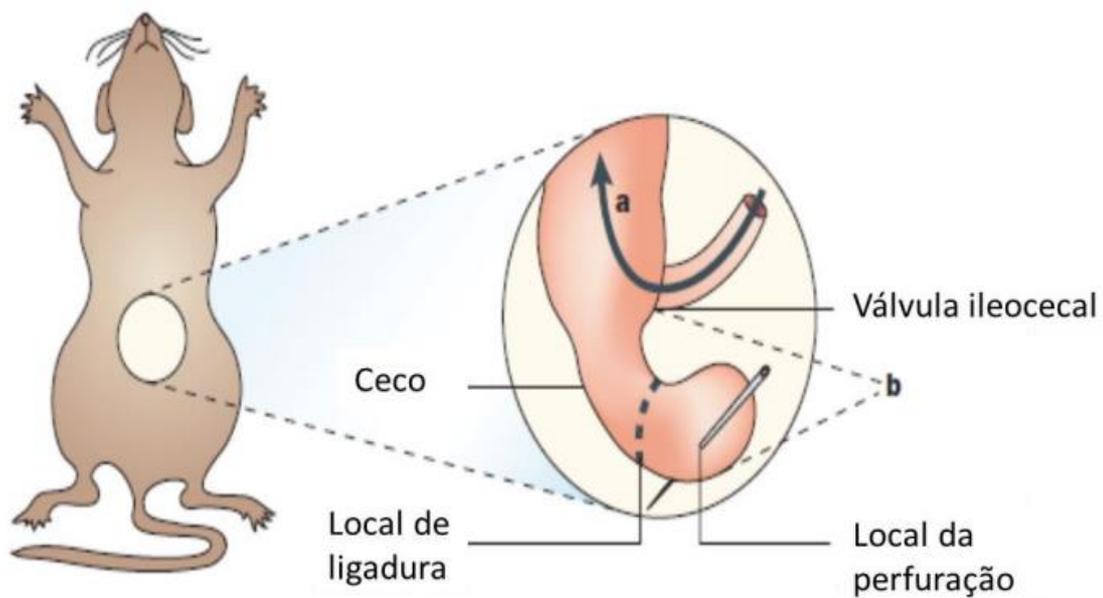


Figura 5: Esquema ilustrativo da ligadura e perfuração do ceco. a) representa a junção entre o intestino delgado e o grosso (ceco); b) representa a porção do ceco onde as perfurações foram realizadas. (Fonte: BURAS et al., 2005, adaptado).

Os animais receberam uma reposição volêmica (s.c.) com soro fisiológico (30 mL/kg) pré-aquecida (37°C), a qual foi administrada imediatamente após o procedimento cirúrgico, para reposição de volume, foram analgésicos com dipirona sódica 80 mg/kg (i.m.) e mantidos em manta térmica aquecida (37°C) até a recuperação pós anestesia. Os animais de todos os grupos passaram a receber reposição volêmica com SF 0,9% nos tempos de 6, 12 e 24, via subcutânea, até a eutanásia.

No grupo dos animais em que foi administrada a HDZ, esses receberam uma dose do medicamento de 1 mg/kg (s.c.), 4 h após a indução da sepse e depois de 12-12 h até tempo final de 48 h. Nos momentos em que a administração da HDZ coincidia ao momento em que os animais seriam avaliados, essa foi administrada após a verificação de todos os parâmetros. Os animais do grupo sham foram submetidos a um procedimento cirúrgico semelhante, onde o ceco foi somente exteriorizado, sem serem perfurados ou obstruídos, e em seguida recolocado no abdômen e a cavidade abdominal suturada (Figura 6).

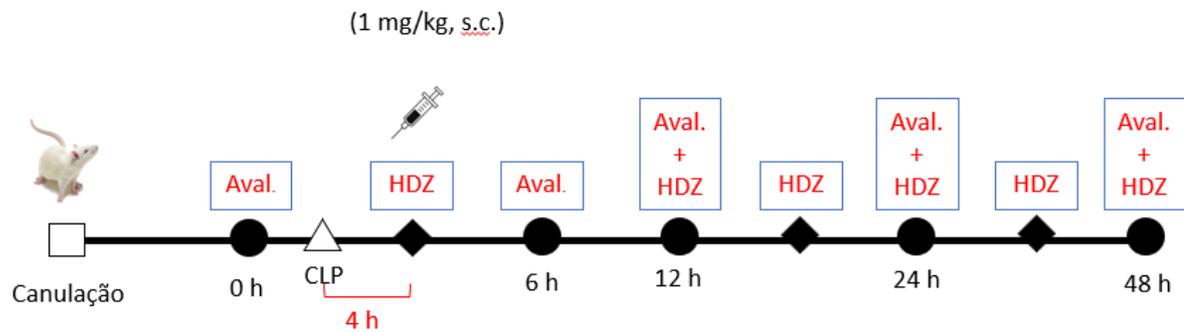


Figura 6: Esquema representativo do delineamento experimental utilizado nesse estudo. Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi realizado um projeto piloto para determinar a dose a ser utilizada nesse estudo, assim como o melhor momento para o início do tratamento. Uma vez que o intuito era usar a substância em um período posterior à indução da sepse, garantindo assim que os animais desenvolvessem um quadro infeccioso, para que pudéssemos avaliar de fato os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do medicamento estudado.

Apesar do modelo de indução da sepse utilizado ser considerado entre suave e moderado, ele apresenta uma elevada taxa de mortalidade. Desta forma, por esse e por outros fatores que acabam por interferir nos experimentos, alguns animais foram repostos após a morte ou perda por algum outro motivo, com o intuito de completar o n mínimo exigido para os testes estatísticos.

4.2.5 Avaliação da taxa de sobrevivência

A taxa de sobrevivência para todos os grupos foi estimada pela curva de Kaplan-Meier em 6, 12, 24 e 48 h após a cirurgia para CLP. Os animais que morreram durante o procedimento cirúrgico ou devido a administração dos anestésicos não foram contabilizados para a avaliação da curva de sobrevivência.

4.2.6 Determinação do escore clínico de gravidade da sepse

A gravidade da sepse foi monitorada por um escore clínico, obtido por meio da verificação individual de sete critérios, são eles: aparência, nível de consciência, atividade, resposta ao estímulo, aspecto dos olhos, frequência respiratória e qualidade da respiração (Quadro 1), conforme estabelecido por Shrum et al., (2014). Esses critérios foram pontuados para todos os grupos nos tempos 0 e 6, 12, 24 e 48 h após

a cirurgia de CLP. Os ratos foram avaliados enquanto ainda estavam em suas gaiolas (com as tampas removidas para melhor visualização).

4.2.7 Avaliação da temperatura corpórea

A temperatura corpórea foi avaliada pela introdução de um termômetro clínico digital (Caretech, Zhenzhong Road/China) no reto dos animais pertencentes a todos os grupos. Antes do início dos experimentos os animais foram ambientados em sala com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). Foram realizadas medidas basais no dia anterior ao início dos experimentos. A temperatura retal foi avaliada nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 h após a indução, em triplicatas, sendo a média desses resultados expressas em $^\circ\text{C}$.

4.2.8 Peso corpóreo

Para avaliar a variação do peso corporal dos animais, foi utilizada uma balança digital (Bioprecisa®, Tijucas do Sul/Brasil). Os animais foram pesados antes da indução da sepse e nos tempos de 6, 12, 24 e 48 h após a cirurgia para CLP.

4.2.9 Determinação da glicemia

A glicemia foi avaliada antes de iniciar os protocolos experimentais e nos tempos de 6, 12, 24 e 48 h após a indução da sepse, com uma gota de sangue obtida por punção da veia caudal e medida pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase/peroxidase, utilizando tiras reagentes (ACCU-CHEK Advantage II, Roche, São Paulo/SP, Brasil) e o glicosímetro (ACCU- CHEK Advantage II, Roche, São Paulo/SP, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante.

4.2.10 Determinação do lactato enzimático

O lactato plasmático foi medido em amostras de sangue coletadas (100 μl) por cateter arterial nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 h. As amostras foram armazenadas em tubos contendo fluoreto de sódio, como inibidor glicolítico, e o anticoagulante EDTA e centrifugadas por 10 minutos a $3.000 \times g$ em temperatura ambiente, seguindo as instruções do fabricante (Labtest, Lagoa Santa/MG, Brasil). Todas as medidas foram realizadas com o auxílio de um espectrofotômetro de espectro multiscan (Femto, Modelo 800XI).

4.2.11 Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos

Neste procedimento, os ratos foram anestesiados e sedados com cetamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/Kg (i.p.), e cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10, soldado a um segmento de PE-50, preenchidos com solução salina heparinizada (1:20 v/v), foram implantados, através de incisão inguinal, na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (scapulae). As incisões foram então suturadas e os animais colocados em caixas individuais, onde permaneceram por um período mínimo de 24 h (recuperação pós-operatória). Logo após o procedimento cirúrgico, os animais foram tratados com dipirona sódica 80 mg/kg (i.m.) para analgesia.

Após o período de recuperação pós-operatório, o cateter arterial foi conectado ao transdutor de pressão (Edwards Lifescience, Irvine, CA, EUA) devidamente pré-calibrado e acoplado a um amplificador (Bridge Amp FE221, ADInstruments). A PA foi registrada em um microcomputador com interface analógico-digital. O sinal de PA foi registrado e processado pelo software computacional LabChart Pro versão 7 (ADInstruments, USA) pontos de inflexão foram identificados e geradas séries temporais batimento a batimento, utilizando frequência de amostragem de 2000 Hz. Valores de PA média (mmHg), sistólica (mmHg), diastólica (mmHg), e FC (bpm) foram obtidos e mensurados. Esses parâmetros foram avaliados nos tempos de 0 e 6, 12, 24 e 48 h após a indução da sepse.

4.3 Realização dos Ensaios de Biologia Molecular

4.3.1 Dosagens de citocinas séricas

As concentrações de TNF- α e IL-1 β (em 6 h) e IL-10 (em 12 h) foram medidos no soro obtido de amostras de sangue coletadas por cateter arterial após a indução da sepse. O sangue foi centrifugado por 10 minutos, a 112 x g em temperatura ambiente e o soro armazenado a -80 °C. As citocinas foram dosadas pelo método de imunoenensaio enzimático (ELISA), conforme metodologia descrita por Moura, 2015 e de acordo com os kits comerciais específicos obtidos, seguindo as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, EUA), para cada

citocina estudada. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, com o auxílio de um espectrofotômetro de espectro multiscan (Femto, Modelo 800XI, São Paulo/Brasil).

4.3.2 Extração de proteínas do tecido

Após o término do acompanhamento dos animais, o baço, fígado e rim foram homogeneizados na proporção de 100 mg de tecido/ml diluído em tampão fosfato 50mM pH 7,4. As amostras foram centrifugadas a 1.008 x g por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios.

4.3.3 Determinação da concentração total de proteínas

A dosagem das amostras de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) utilizando o BSA (albumina do soro bovino) para fazer a curva padrão.

4.3.4 Atividade da enzima mieloperoxidase

A atividade da MPO foi determinada no baço, fígado e rim e expressa em U/g de tecido, de acordo com o procedimento descrito por Hillegass et al., (1990) com pequenas modificações. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM pH 6,0 contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% e centrifugado a 14.000 xg por 2 min a 4°C. O sobrenadante (5 µL) foi misturado com 200 µL de tampão fosfato 50 mM contendo orto-dianisidina (1,167 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (1%). A atividade da MPO foi medida com o auxílio de um espectrofotômetro multiscan de espectro a 460 nm (Femto, Modelo 800XI, São Paulo/Brasil).

4.3.5 Avaliação do estresse oxidativo

4.3.5.1 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi mensurada através da adição de 10 µL de amostras no tampão fosfato (pH 7.4) (AEBI, 1984). A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no tampão da amostra. Após a adição do H₂O₂ à temperatura de 32°C a catalase passa a decompor o H₂O₂, que pode ser mensurado em onda a 240 nm. Uma unidade da CAT é definida através do consumo de um µmol de H₂O₂ por minuto, assim atividade enzimática foi expressa em units/mg de proteína.

4.3.5.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A enzima SOD é envolvida na oxidação da epinefrina. A disponibilidade da SOD, enzima capaz de remover radical superóxido $O_2^{\bullet-}$, catalisa a dismutação do oxigênio (O_2) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MARKLUND, 1985). A oxidação da epinefrina seguiu os termos da produção de adrenocromo, no qual exhibe absorção máxima de 480 nm, salvo que, todas as reações acontecem a 32°C. A reação foi iniciada pela adição de epinefrina ácida (pH 2,0) à mistura da reação tamponada. Uma unidade SOD é definida com base na quantidade de enzima necessária para causar a inibição de 50% da velocidade de redução do adrenocromo, formação de superóxido num sistema (MARKLUND, 1985).

4.3.6 Avaliação dos marcadores de dano oxidativo

4.3.6.1 Marcador de dano lipídico

O complexo formado por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é amplamente usado como biomarcador de peroxidação lipídica em sistemas biológicos, pois a determinação destes produtos envolve a quantificação dos aldeídos formados durante a peroxidação lipídica, resultantes da degradação de hidroperóxidos, que reagem com o ácido tiobarbitúrico, incluindo o malondialdeído (MDA) (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990).

Amostras foram coletadas, cortadas em pequenos pedaços e homogeneizadas em solução de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4). Em seguida, alíquotas contendo 200 μ L do homogenato (em duplicata) foram incubadas a 90°C durante 45 min com 400 μ L de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%, em ácido tricloroacético (TCA, do inglês trichloroacetic acid) a 12%. No final da incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 1.008 x g, e 300 μ L do sobrenadante foram retirados e submetidos à extração do produto de reação com igual volume de n-butanol e 30 μ L solução saturada de NaCl, seguida pela agitação em vórtex por 30 s e centrifugação durante 2 min a 1.008 x g. Os sobrenadantes foram pipetados em placa de 96 poços para leitura dos valores de absorbância em leitor de microplaca Spectra Max plus 384® (Sunnyvale, CA, EUA) a 535 nm (corrigidos pelos valores de absorbância a 572 nm). Os resultados foram expressos como nmol de MDA/mg de tecido (BOSE; SUTHERLAND; PINSKY, 1989), utilizando-se, para o cálculo, o

coeficiente de extinção molar do MDA de $1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

4.3.6.2 Marcadores de danos proteico

Grupamentos tióis, compostos organossulfurados que contêm um ou mais grupos sulfidril (-SH), indicam padrão redox do meio celular. Se há maior quantidade de SH, supõe-se que o meio se encontra redutor; se há menor quantidade de SH, meio oxidante. A determinação do conteúdo de sulfidril foi realizada através da reação do dissulfeto aromático, ácido ditionitrobenzóico – ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) – (DTNB), com os grupos sulfidril (SH) livres das proteínas, utilizando metodologia descrita por Ellman (1959). Na técnica, os grupos -SH (1) reagem com DTNB (2), resultando na formação da proteína tionitrofenilada (3) e um ânion – 2-nitro-5-tiobenzoato – TNB (4), amarelado. As amostras dissecadas foram homogeneizadas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), com auxílio de homogeneizador de tecidos Pollytron® (13000 rpm), durante 15 segundos, com os tubos sempre mantidos em gelo. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (15 min a 14000 rpm, 4°C) para a obtenção do sobrenadantes. Com os sobrenadantes, procedeu-se a dosagem de proteínas para normalização das amostras na concentração 1 ug/uL de proteína.

Em microplaca com 96 poços, foi pipetado 50 µL das amostras normalizadas, exceto nos brancos, 115 µL de PBS em todos os poços, 35 µL de tampão forte (solução de EDTA 0,2 mM e ácido bórico 100 mM, pH 8,5). A reação foi iniciada pela adição de 10 µL de DTNB em todos os poços. Após incubar de 1 hora em temperatura ambiente, procedeu-se a leitura da absorbância em leitor de microplacas Spectra Max plus 384 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA) a 412 nm (corrigidos pelos valores de absorbância do branco) para mensuração da quantidade de TNB formado que, está relacionado à quantidade de grupos tióis presentes na amostra.

A carbonilação de proteínas será determinada de acordo com LEVINE et al., (1990). Amostras de tecido serão homogeneizadas com tampão fosfato (pH=7,4) e centrifugadas a $1.008 \times g$ por 15 min. O sobrenadante será coletado e uma alíquota será usada para a dosagem de proteínas. Posteriormente, duas alíquotas separadas de 1 mg de proteínas serão incubadas com DNPH ou HCl (0,2M) por 1 h a temperatura ambiente. As proteínas serão precipitadas com TCA 10% e a fração proteica será usada para a medida da carbonilação. Após a precipitação das proteínas, uma

sequência de 3 lavagens com etanol-acetato de etila (1:1) será realizada e as proteínas serão dissolvidas em ureia 8M. A quantidade de grupos carbonila será determinado a 370 nm.

Os valores foram expressos em U/mg de proteína e todas as medidas foram realizadas em espectrofotômetro de espectro multiscan (Femto, Modelo 800XI, São Paulo/Brasil).

4.3.7 Determinação do imunoconteúdo proteico por western blot

Os órgãos (baço, fígado e rim) foram homogeneizados em tampão de lise celular (20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% Nonidet NP40; 1% desoxicolato de sódio; 0,1% SDS) contendo inibidores de protease e fosfatase (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, França). As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado. A dosagem de proteínas foi realizada usando o método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A extração de proteína total foi realizada usando RIPA Lysis and Extraction Buffer (Thermo Fisher Scientific). As proteínas (40-80 µg por poço) foram separadas usando géis de 10 a 12% SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) sob uma voltagem constante de 20 volts em tampão glicina/tris (192 mM e 25 mM, respectivamente) contendo metanol (1:4) por 1 h, usando um sistema Trans-Blot semi-seco (Bio-Rad, Estados Unidos). As membranas foram então bloqueadas com BSA a 3% em solução salina tamponada com fosfato contendo Tween 20 à temperatura ambiente durante 1 h. As membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C, com os seguintes anticorpos primários: Akt fosforilada (S473) (1:1000; 4060S); Akt total (pan - C67E7) (1: 1000; 4691S) e β-Actina (1: 2000; 4967S) (Cell Signaling, Ozyme, França). Após a etapa de lavagem (3 x 10 min), a membrana foi incubada em anticorpo secundário durante a noite a 4°C. A imunorreatividade foi detectada por quimioluminescência intensificada usando Luminata strong™ - substrato Western HRP (Merck-Millipore, MA, EUA) e a banda alvo foi capturado pelo dispositivo iBright CL1000 (Invitrogen, Massachusetts, EUA). As imagens obtidas foram analisadas no software Image J® e os resultados expressos em unidades arbitrárias (UA) obtidos a partir da relação entre as unidades densitométricas das proteínas estudadas.

4.4. Análise Estatística

As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de log-rank (Mantel-Cox). Para outros experimentos, os valores foram expressos como a média +/- erro padrão da média (EPM) e a significância das diferenças entre as médias foi avaliada usando, quando necessário, a análise de variância de uma via (ANOVA), para analisar a variação na perda de peso corporal, citocinas, MPO, atividade do estresse oxidativo (CAT, SOD, TBARS, sulfidril e carbonil) e western blot. Escore clínico de sepse, parâmetros hemodinâmicos, glicose no sangue, lactato e temperatura ANOVA de duas vias. O pós-teste de Tukey foi realizado e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para todos esses procedimentos, bem como para a confecção dos gráficos, foi utilizado o programa Graph Pad Prism versão 5.0 (San Diego, CA, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk.

5 RESULTADOS

5.1 Revisão Sistemática

A revisão sistemática resultou na produção e publicação do artigo intitulado: “Association between peripheral perfusion, microcirculation and mortality in sepsis: a systematic review”. O artigo foi publicado na Revista Brasileira de Anestesiologia, qualis B1, o qual segue para apreciação em anexo (Anexo B).

5.1.1 Resultados da seleção dos estudos

Foram encontrados 1.344 artigos na PubMed, 2.248 na Web of Science, 547 na Scopus e 41 na Cochrane, total de 4.180 artigos. Após excluir 2.012 artigos duplicados, passamos à leitura de 2.168 títulos e resumos. Após o descarte de 12 artigos que não apresentavam resumos e/ou textos, também foram excluídos 84 artigos não mostrados na íntegra (resumos, relatos de conferências, pôsteres de conferências, editoriais, cartas, relatos de casos), 209 artigos por não apresentarem análises ou metanálises, 280 por serem estudos com animais ou pré-clínicos e 1.541 artigos cujo assunto não atendeu aos critérios deste estudo. No total, 42 artigos foram selecionados para uma leitura completa. No fim dessa etapa, 26 artigos foram finalmente selecionados (Figura 4). Houve um alto nível de concordância sobre a inclusão e a exclusão dos estudos entre os dois pesquisadores que examinaram os artigos encontrados na pesquisa.

Os pacientes avaliados eram heterogêneos e estavam gravemente enfermos, o que é típico da sepse. Os estudos incluíram 2.465 pacientes. Os escores Apache variaram de 4 a 28,8 (mediana = 19,5 [15,7 – 21,5]) para os pacientes com sepse e de 18 a 23 (mediana = 21 [20 – 23]) para os pacientes com sepse grave, enquanto os escores SOFA variaram de 4 a 13 (mediana = 10 [8 – 11]) para o grupo de pacientes com sepse e de 4 a 11 (mediana = 8,3 [6 – 9,5]) para o grupo de pacientes com sepse grave. A PAM variou de 67 a 89 mmHg (média = 76,77 ± 5,94 mmHg) para os pacientes com sepse e de 69 a 75 mmHg (média = 71 ± 2,28 mmHg) para os pacientes com sepse grave. A FC nos pacientes com sepse variou de 88 a 115 bpm (média = 102,9 ± 7,35 bpm) e nos pacientes com sepse grave de 92 a 114 bpm (média = 103,2 ± 7,8 bpm).

Em relação à qualidade dos estudos, 77% dos estudos de caso-controle, 66% dos estudos de coorte e 64% dos estudos transversais foram considerados de alta qualidade, de acordo com os critérios usados pelos autores.

5.1.2 Associação entre perfusão periférica, microcirculação e mortalidade na sepse

Os métodos de mensuração da perfusão vascular mais usados foram NIRS (7 artigos) e SDF (5 artigos). O leito microvascular mais estudado foi a microcirculação sublingual/bucal (8 artigos), seguida por circulação nos dedos (4 artigos) (Quadro 2). Os dados sobre perfusão microvascular e mortalidade em 23 dos artigos incluídos no estudo (Quadro 2) mostraram claramente uma associação entre má perfusão periférica e alta mortalidade, apenas três artigos não mostraram associação. Portanto, dos 26 artigos incluídos na revisão, cinco avaliaram pacientes em departamentos de emergência e 21 avaliaram pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) (Quadro 2). A mortalidade variou de 3% a 71% (mediana = 37% [28,6 – 43,7]).

Quadro 2: Associação entre diagnóstico de hipoperfusão periférica e mortalidade em sepse

Referência	Metodologia	Resultados principais	
		Mortalidade	Perfusão periférica vs. mortalidade
De Backer et al., 2002.	Adultos de UTI; Grupos: controle (n = 10), pacientes com sepse (n = 50), pacientes antes de cirurgia cardíaca (n = 16) e pacientes não infectados gravemente doentes (n = 5). A microcirculação sublingual foi investigada com imagens OPS.	44% (o tempo de acompanhamento não foi claramente informado)	A proporção de pequenos vasos perfundidos foi reduzida nos pacientes sépticos comparados aos pacientes controles. As deficiências mais graves no fluxo sanguíneo microvascular foram encontradas nos pacientes sépticos não sobreviventes.
Sakr et al., 2004.	Adultos em UTI; Grupos: controle (4) e choque séptico (n = 46). A microcirculação sublingual foi investigada com imagens OPS.	43% em 7 dias.	No início do choque, sobreviventes e não sobreviventes apresentaram densidades vasculares e porcentagens semelhantes de pequenos vasos perfundidos. A perfusão de pequenos vasos melhorou com o tempo nos sobreviventes, mas não nos não

Referência	Metodologia	Resultados principais	
		Mortalidade	Perfusão periférica vs. mortalidade
			sobreviventes. As alterações microcirculatórias foram semelhantes nos que morreram por falência de múltiplos órgãos (MOF) após a resolução do choque e nos que morreram por choque.
Doerschug et al., 2007.	Adultos de UTI; Grupos: controle (n = 15) e sepse grave (n = 24). O fluxo microvascular foi estimado pelo método NIRS.	33% em 30 dias	Este estudo mostrou que a hemoglobina microvascular foi significativamente reduzida nos pacientes sépticos. Além disso, a taxa do consumo de oxigênio tecidual e a taxa de aumento da StO ₂ durante a hiperemia reativa foram significativamente mais lentas nos pacientes sépticos. A StO ₂ em repouso medida 24 horas após o início da disfunção orgânica não foi associada à falência ou sobrevida dos órgãos em 7, 14 ou 30 dias.
Trzeciak et al., 2008.	Adultos de DE e UTI; Grupos: controle (n = 5) e sepse grave/choque séptico (n = 26). A microcirculação sublingual foi avaliada por imagem OPS.	42% de mortalidade hospitalar.	Os índices microcirculatórios iniciais (menor velocidade de fluxo e perfusão heterogênea) foram mais acentuadamente prejudicados nos não sobreviventes comparados aos sobreviventes. Esses mesmos índices foram mais acentuadamente prejudicados com o aumento da gravidade da disfunção cardiovascular sistêmica
Leone et al., 2009.	Adultos de UTI; Grupos: nenhum grupo controle e choque séptico (n = 42). A saturação de oxigênio tecidual (StO ₂) foi	31% em 28 dias	Os valores de StO ₂ foram significativamente menores nos não sobreviventes que nos sobreviventes. Nos pacientes com choque

Referência	Metodologia	Resultados principais	
		Mortalidade	Perfusão periférica vs. mortalidade
	monitorada pelo método NIRS.		séptico, a saturação de oxigênio tecidual abaixo de 78% foi associada ao aumento da mortalidade em 28 dias.
Spanos et al., 2010.	Adultos de DE; Grupos: controle (n = 16), sepse (n = 29) e sepse grave (n = 19). A microcirculação sublingual foi avaliada por imagem SDF.	3% sepse 37% sepse grave aos 28 dias	O índice de fluxo microvascular e a densidade dos vasos perfundidos foram pequenos no grupo com sepse grave comparado ao grupo com sepse. A proporção de vasos perfundidos foi significativamente reduzida nos pacientes que não sobreviveram.
Sakr et al., 2010.	Adultos de UTI; Grupos: voluntários saudáveis (n = 20), grupo controle em UTI (n = 8) e choque séptico (n = 21). A perfusão foi medida com LDF/VLS.	7% de mortalidade em UTI	A HbO ₂ da mucosa bucal nas 24 horas seguintes ao início do choque séptico foi menor nos não sobreviventes que nos sobreviventes. O fluxo da mucosa bucal aumentou durante o 2º dia de choque séptico nos sobreviventes e diminuiu posteriormente.
Ait-Oufella et al., 2011.	Adultos de UTI; Grupos: sem grupo controle, choque séptico (n = 60). A perfusão microvascular foi avaliada pelo escore de descoloração irregular da pele.	45% em 14 dias	O escore de descoloração irregular da pele foi um forte preditivo de mortalidade, atingiu uma razão de chances de 74 quando o escore foi 4-5.
Rodriguez et al., 2011.	Adultos de UTI; Grupos: controle (n = 50) e choque séptico (n = 19). O índice regional de saturação de oxigênio (rSO ₂) foi obtido no músculo braquiorradial. As mensurações foram feitas pelo método NIRS.	57% (o tempo de acompanhamento não foi claramente informado)	No choque séptico, os valores de rSO ₂ foram menores nos não sobreviventes que nos sobreviventes na fase basal, 12 horas e 24 horas após a admissão em UTI.
Shapiro et al., 2011.	Adultos de DE; Grupos: controle (n = 50), choque séptico (n = 58) e sepse (n = 60).	Sepse 5%, choque séptico 38% de	As mensurações via NIRS para StO ₂ inicial, inclinação de oclusão de StO ₂ e inclinação de

Referência	Metodologia	Resultados principais	
		Mortalidade	Perfusão periférica vs. mortalidade
	A perfusão foi avaliada por StO ₂ tecidual pelo método NIRS.	mortalidade hospitalar	recuperação de StO ₂ foram menores nos pacientes com choque séptico comparado aos pacientes sépticos. A inclinação de recuperação foi mais fortemente associada à disfunção orgânica e mortalidade. No entanto, a StO ₂ não foi diferente entre os sobreviventes e não sobreviventes, com uma área pouco favorável sob a curva para mortalidade (0,56).
Ait-Oufella et al., 2012.	Adultos de UTI; Grupos: sem grupo controle, grupo choque séptico (n = 52). A perfusão foi avaliada pela StO ₂ tecidual medida pelo método NIRS ao redor do joelho.	48% em 14 dias	Após a ressuscitação do choque séptico inicial, uma StO ₂ mais baixa medida ao redor do joelho é um forte fator preditivo de mortalidade em 14 dias.
Edul et al., 2012.	Adultos de UTI; Grupos: controle (n = 25) e choque séptico (n = 25). A microcirculação sublingual foi avaliada por imagem SDF.	56% de mortalidade hospitalar	Com uma avaliação quantitativa de imagem SDF, os não sobreviventes exibiram redução da densidade capilar perfundida, da proporção de capilares perfundidos e do índice de fluxo microvascular, juntamente com o aumento do índice de fluxo de heterogeneidade, comparado aos sobreviventes.
De Backer et al., 2013.	Adultos de UTI; Grupos: sem grupo controle, grupo sepse grave (n = 252). A microcirculação sublingual foi avaliada por imagens SDF ou OPS.	51% de mortalidade em UTI	As taxas de sobrevivência diminuíram acentuadamente com a gravidade das alterações na proporção de pequenos vasos perfundidos (quartis inferiores). A mortalidade foi significativamente maior nos pacientes com menor perfusão

Referência	Metodologia	Resultados principais	
		Mortalidade	Perfusão periférica vs. mortalidade
			microvascular medida por esses métodos.
He et al., 2013.	Adultos de UTI; Grupos: controle (n = 20) e choque séptico (n = 46). PI derivado de oximetria e 10 min-OCT foram usados para estimar a perfusão.	43% de mortalidade em UTI	PI e OCT foram preditivos de mortalidade para pacientes sépticos após a ressuscitação. Para PI, a sensibilidade e especificidade para mortalidade foram 65% e 92%, respectivamente. Para OCT, a sensibilidade e especificidade foram 65% e 96%, respectivamente.
Hernandez et al., 2013.	Adultos; Grupos: sem grupo controle, grupo choque séptico (n = 122). A microcirculação sublingual foi avaliada por imagem SDF.	33% de mortalidade hospitalar	A densidade dos vasos perfundidos foi significativamente relacionada a disfunções orgânicas e mortalidade nos pacientes com choque séptico, particularmente nos pacientes com anormalidades mais graves (quartil de distribuição mais baixo para esse parâmetro).
Ait-Oufella et al., 2014.	Adultos de UTI; Grupos: sem grupo controle, grupo choque séptico (n = 59). A perfusão foi avaliada por TRC no dedo e na área do Joelho.	36% em 14 dias	O TRC foi fortemente preditivo de mortalidade. A área abaixo da curva para previsão foi de 84% (75-94) para a mensuração no dedo e de 90% (83-98) para a área do Joelho.
Mari et al., 2014.	Adultos de uma UTI; Grupos: sem grupo controle, grupo choque séptico (n = 56). A avaliação da perfusão periférica foi mensurada com 15 minutos de OCT.	31% em 28 dias	Na admissão (T0), 15 min-OCT foi semelhante entre sobreviventes e não sobreviventes; 24 horas após a admissão (T24), os sobreviventes tiveram um valor significativamente mais alto de OCT que os não sobreviventes.
Galbois et al., 2015.	Adultos de UTI; Grupos: controle (n = 75) e pacientes com cirrose hepática admitidos por choque séptico (n = 42). A perfusão da pele foi	71% em 14 dias	O mottling score e a StO2 do Joelho 6 h após a internação foram preditivos muito específicos de mortalidade em 14 dias

Referência	Metodologia	Resultados principais	
		Mortalidade	Perfusão periférica vs. mortalidade
	avaliada pelo mottling score na pele e StO ₂ tecidual medido com o método NIRS.		nos pacientes com cirrose e choque séptico.
Rasmy et al., 2015.	Adultos de UTI; Grupos: sem grupo controle, grupo sepse grave (n = 36), pacientes divididos em tratados com vasopressores (n = 21) e sem vasopressores (n = 15). PI derivado da oximetria foi usado para medir a perfusão periférica.	40% em 28 dias	PI conseguiu prever mortalidade com sensibilidade e especificidade variadas. O melhor ponto de corte do PI foi de 0,21 (sensibilidade de 86% e especificidade de 90%).
Rodríguez et al., 2015.	Adultos de UTI; Grupos: sem grupo controle, grupo sepse (n = 19). Duas sondas de um dispositivo NIRS foram colocadas simultaneamente nos músculos braquiorradial e deltoide.	21% de mortalidade em UTI	Os não sobreviventes apresentaram valores de rSO ₂ significativamente mais baixos que os sobreviventes em todos os momentos do estudo. Ambos os músculos mostraram poder discriminatório consistente para mortalidade.
Bourcier et al., 2016.	Adultos de UTI; Grupos: sem grupo controle; sepse grave (n = 40) e choque séptico (n = 63). A perfusão periférica foi medida com quatro gradientes de temperatura, TEC e mottling score.	36% de mortalidade em UTI	O gradiente de temperatura periferia-ambiente e suas variações são preditivos independentes de mortalidade devido à falência de múltiplos órgãos em pacientes com choque séptico. O aumento do CTR e o alto mottling score também foram preditivos de mortalidade
Houwink et al., 2016.	Adultos de UTI; Grupos: sem grupo controle, grupo choque séptico (n = 821). A perfusão periférica foi medida com o gradiente de temperatura central e periférico (Delta T).	26% de mortalidade hospitalar	Delta T em 24 horas, mas não na admissão, é independentemente associado à mortalidade.
Erikson et al., 2017.	Adultos de UTI; Grupos: sem grupo	12% em 30 dias	Não houve diferenças nas taxas de mortalidade entre

Referência	Metodologia	Resultados principais	
		Mortalidade	Perfusão periférica vs. mortalidade
	controle, grupo sepse (n = 31). O fluxo sanguíneo retiniano foi medido com angiografia com fluoresceína e RAFT.		os pacientes com fluxo sanguíneo retiniano diferente (RAFT menor ou maior).
Fontana et al., 2017.	Adultos de UTI; Grupos: sem grupo controle, sepse grave (n = 27) e choque séptico (n = 95). A microcirculação foi avaliada com imagens SDF.	43% de mortalidade em UTI	PPV e MFI foram menores nos não sobreviventes do que nos sobreviventes. Esses parâmetros foram preditores independentes de mortalidade.
Lara et al., 2017.	Adultos de DE; Grupos: sem grupo controle, sepse (n = 95). A avaliação da perfusão periférica foi mensurada por TEC.	63% de mortalidade hospitalar	Pacientes sépticos hiperlactatêmicos com TEC anormal após a ressuscitação hídrica inicial exibiram maior mortalidade e piores desfechos clínicos que os pacientes com TEC normal.
Macdonald et al., 2019.	Adultos de DE; Grupos: controle (n = 180) e sepse (n = 143). A perfusão foi avaliada por StO ₂ usando o método NIRS.	7% em 28 dias	StO ₂ inferior a 75% 72 horas após a internação foi associada à mortalidade hospitalar/internação em UTI, independente de qSOFA e lactato.

DE, departamento de emergência; HbO₂, saturação de oxigênio-hemoglobina; IFM, índice de fluxo microvascular; IP, índice de perfusão; LDF, fluxometria por laser Doppler; NIRS, espectroscopia no infravermelho próximo; OCT, desafio transcutâneo de oxigênio; OPS, imagem espectral por polarização ortogonal; RAFT, tempo de enchimento arterial retiniano; rSO₂: índice regional de saturação de oxigênio; SOFA, avaliação sequencial de falência de órgãos; StO₂, saturação de oxigênio tecidual; TEC, tempo de enchimento capilar; UTI, unidade de terapia intensiva; VLS, espectroscopia com luz no espectro visível; VPP, proporção de pequenos vasos perfundidos.

5.2 Resposta à pergunta norteadora

Entre os pacientes sépticos, o diagnóstico de hipoperfusão e anomalias da microcirculação em órgãos não vitais esteve associado ao aumento da mortalidade em quase todos os estudos selecionados nesta revisão. A associação foi encontrada independentemente de terem sido avaliados precocemente ou tardiamente em relação ao tempo de manejo hemodinâmico da sepse. No entanto, esses resultados ainda não estabelecem uma relação causal e estudos adicionais devem ser realizados para verificar se essa associação pode ser considerada um marcador de gravidade

ou um fator desencadeante de falência orgânica e mau prognóstico na sepse.

5.3 Efeito da HDZ sobre a taxa de sobrevivência e o escore clínico da sepse

Como esperado, a taxa de sobrevivência para o grupo sham foi de 100% e essa apresentou uma significativa redução para 50% nos animais do grupo sepse. Por outro lado, a taxa de sobrevivência para os animais com sepse e que foram tratados com a HDZ foi aumentada para 90% (Figura 7).

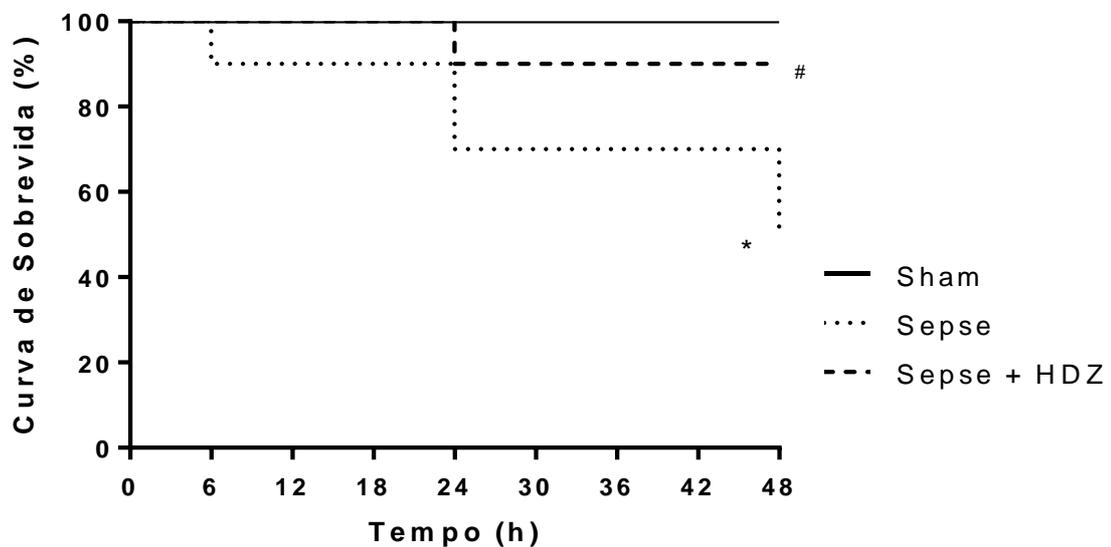


FIGURA 7: Curva de sobrevivência para os grupos sham, sepse e sepse + HDZ avaliados por até 48 h. Os resultados estão expressos como porcentagem de sobrevivência e foram analisados usando um teste de log-rank (Mantel-Cox) ($n = 10$). * $p < 0,05$ vs grupo sham. # $p < 0,05$ vs grupo sepse. HDZ, hidralazina.

Em consonância com a taxa de sobrevivência, o score clínico da sepse para o grupo sham foi a menor entre eles ($1,5 \pm 0,26$ u.a.) e aumentou significativamente (demonstrando uma maior gravidade) em animais com sepse ($10,6 \pm 0,51$ u.a.). Por outro lado, nos animais tratados com a HDZ, o escore de sepse clínica foi significativamente reduzido (menos grave) ($6,5 \pm 0,40$ u.a. $p < 0,05$) (Figura 8).

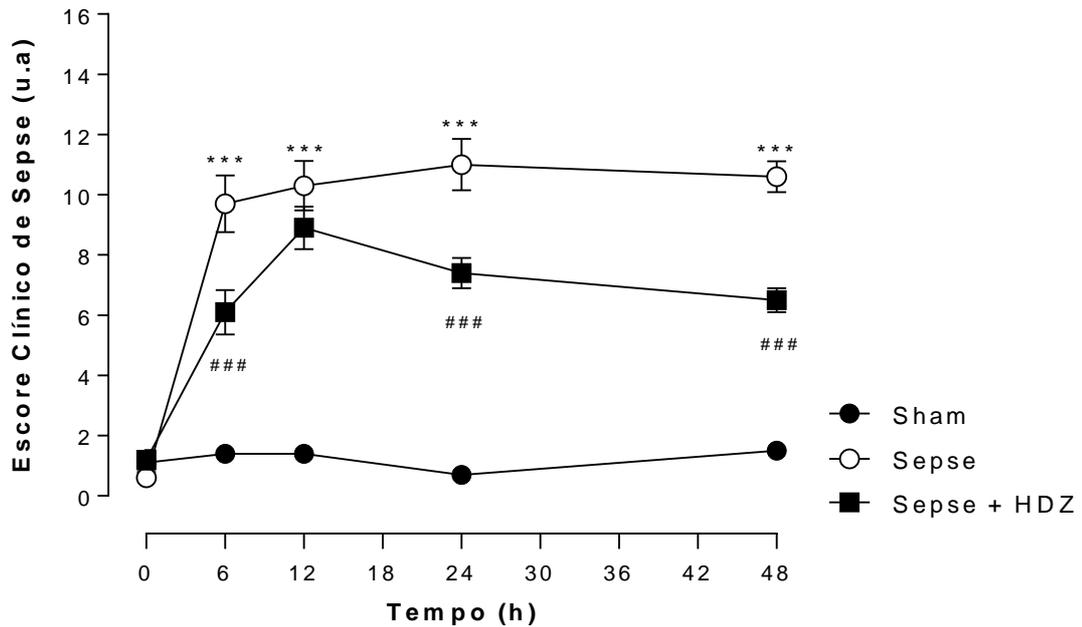


FIGURA 8: Escore clínico de sepse em animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os valores representam a média \pm EPM e foram analisados pela ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 10$). *** $p < 0,001$ vs grupo sham. ### $p < 0,001$ vs grupo sepse. HDZ, hidralazina.

5.4 Efeito da HDZ sobre a variação da temperatura e do peso corporal

A temperatura corporal basal e o peso corporal dos animais de todos os grupos foram semelhantes entre si. Após 48 h, observou-se redução da temperatura no grupo sepse ($33,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) quando comparado ao grupo sham ($35,2 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$). Essa redução da temperatura foi significativamente menor nos animais que foram tratados com HDZ ($34,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$) (Figura 9).

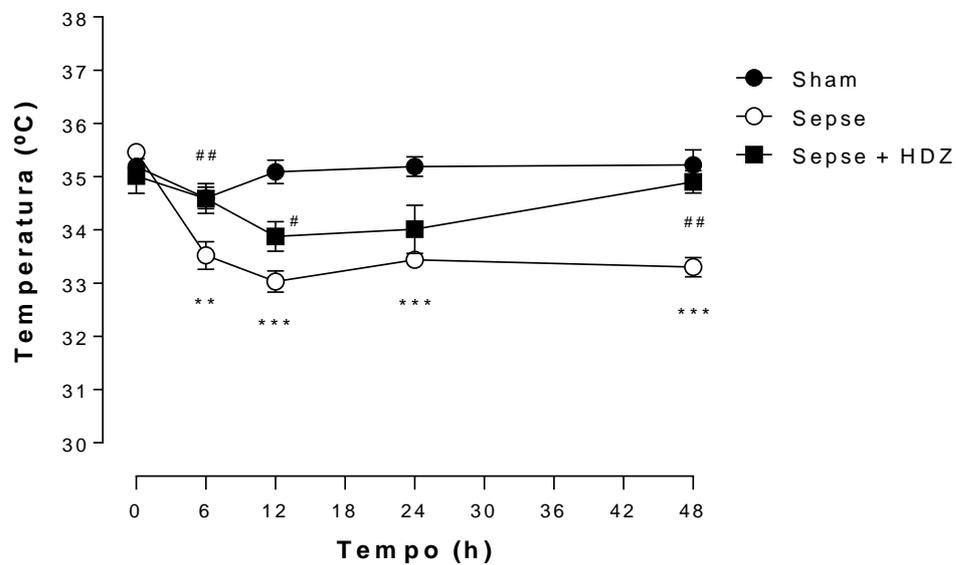


FIGURA 9: Variação da temperatura dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os valores representam a média \pm EPM e foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey ($n = 10$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs grupo sham. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs grupo Sepse. HDZ, hidralazina.

O peso corporal basal (tempo 0 h) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ foi de $272,8 \pm 3,3$; $295,9 \pm 4,3$; e $286,7 \pm 3,9$ g, respectivamente (Figura 10-A). Para avaliar a variação na perda de peso dos animais, foi calculado a diferença entre o peso inicial e o peso final de cada animal (delta). Conforme mostrado na figura 10-B, os animais com sepse perderam significativamente mais peso corporal ($-15,29 \pm 3,59$ g) quando comparados ao sham ($-6,50 \pm 2,16$ g; $p < 0,05$). Embora não tenha havido diferença significativa entre sepse e sepse + HDZ, é possível observar uma tendência a reduzir essa perda de peso corporal, quando os animais foram administrados com a HDZ ($-11,50 \pm 3,27$ g) em comparação ao grupo sepse.

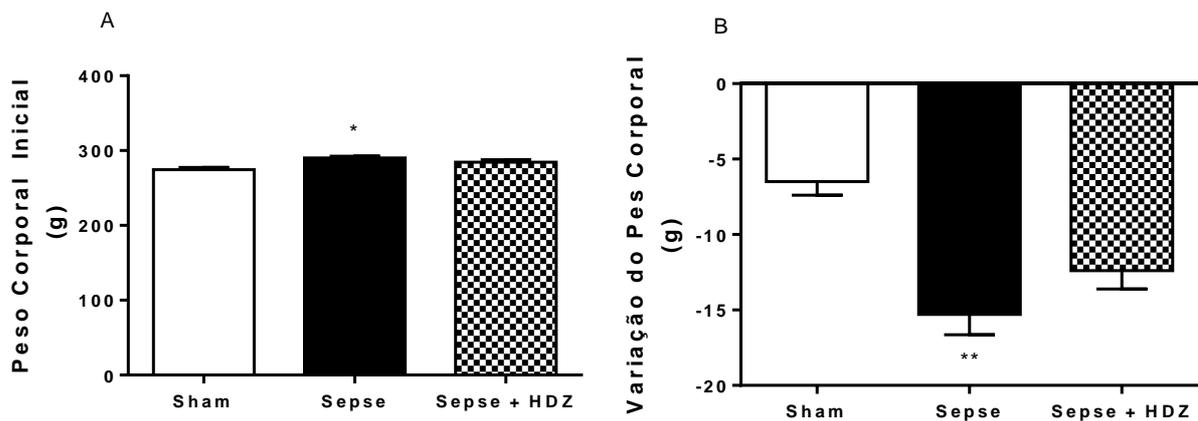


FIGURA 10: Peso corporal inicial (A) e variação do peso corporal (delta) (B) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ durante o período experimental de 48 h. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 10$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ vs grupo sham. HDZ, hidralazina.

5.5 Efeito da HDZ sobre as concentrações da glicemia e do lactato

As concentrações basais de glicose no sangue dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ foram medidos antes da cirurgia de CLP e não apresentaram diferença significativa entre eles ($104,7 \pm 2,8$; $104,9 \pm 2,5$; e $107,5 \pm 2,9$ mg/dL, respectivamente). Essa concentração permaneceu inalterada nos animais do grupo sham ($113,8 \pm 1,7$ mg/dL) no decorrer das 48 h avaliadas. Porém, foi significativamente reduzido no grupo sepse ($87,6 \pm 2,8$ mg/dL). Essa redução foi significativamente evitada pela administração com a HDZ ($106,5 \pm 2,1$ mg/dL) (Figura 11).

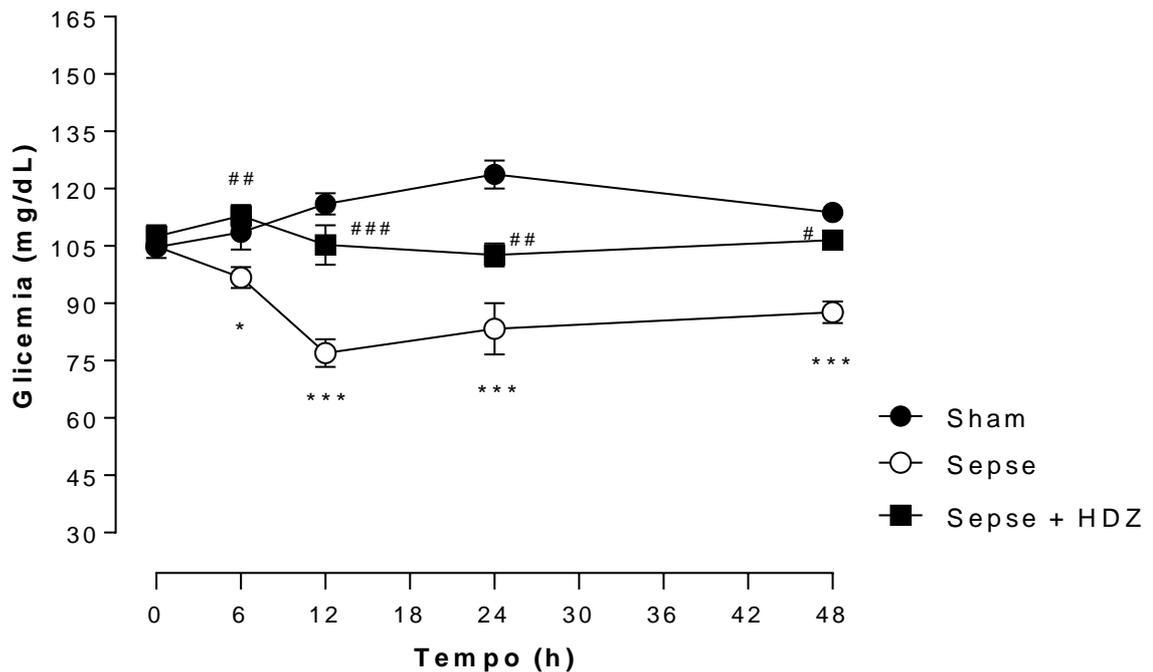


FIGURA 11: Concentração de glicose no sangue dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os valores representam a média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey ($n = 10$). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs grupo sham. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs grupo sepse. HDZ, hidralazina.

Semelhante ao encontrado na glicemia, as concentrações basais do lactato não foram significativamente diferentes entre os grupos sham, sepse e sepse + HDZ ($14,7 \pm 1,9$; $13,8 \pm 0,6$; $13,1 \pm 0,9$ mg/dL, respectivamente). Em animais com sepse, as concentrações do lactato aumentaram significativamente nas 12 h do estudo, mantendo-se elevado até as 48 h ($36,2 \pm 1,5$ mg/dL), quando comparados ao sham ($14,14 \pm 0,8$ mg/dL). A administração com HDZ foi capaz de prevenir esse aumento ($18,03 \pm 1,1$ mg/dL), quando comparado ao grupo sepse, e permaneceu próximo aos valores do grupo sham em todos os tempos avaliados (Figura 12).

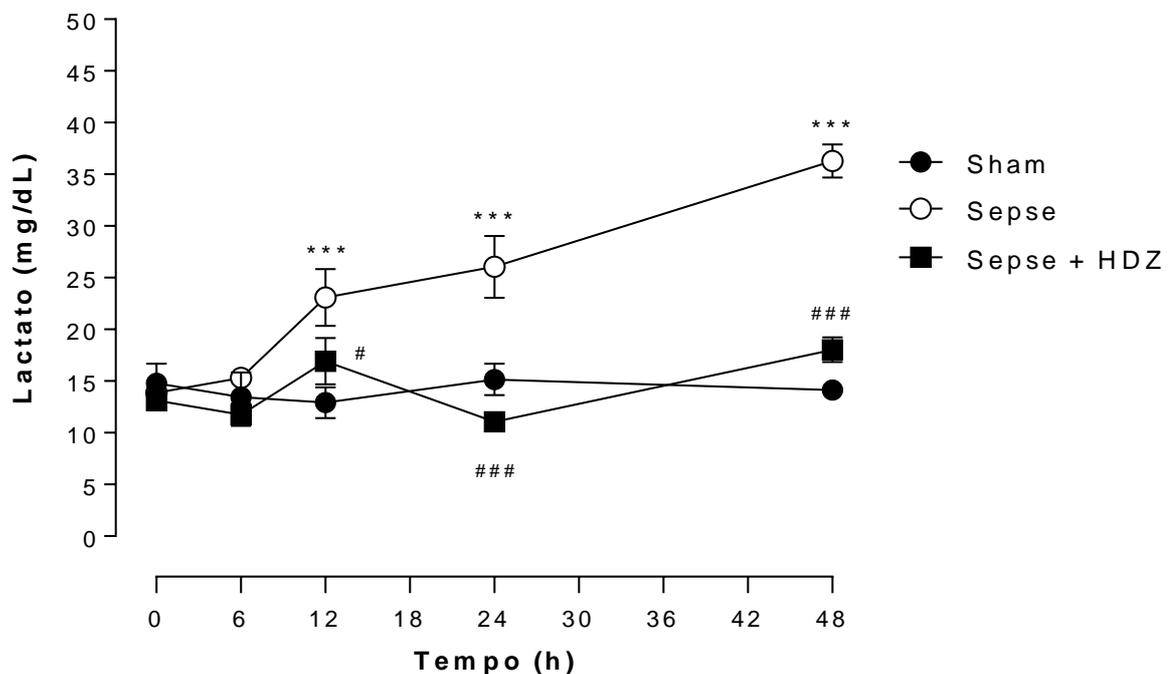


FIGURA 12: Concentração de lactato nos animais dos grupos sham, sepse, Sepse + HDZ. Os valores representam a média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 10$). *** $p < 0,001$ vs grupo sham. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ vs grupo sepse. HDZ, hidralazina.

5.6 Efeito da HDZ sobre os parâmetros hemodinâmicos

Os valores basais da PAM e FC para os grupos sham, sepse e sepse + HDZ não foram diferentes entre si ($117,2 \pm 1,8$; $120,5 \pm 2,1$; $117,9 \pm 2,9$ mmHg, respectivamente). Porém, após 48 h, observou-se que a PAM do grupo sham permaneceu inalterada ($122,8 \pm 2,2$ mmHg), ao contrário do grupo sepse, que apresentou uma redução significativa ($105,7 \pm 3,7$ mmHg). A administração com a HDZ causou uma redução adicional da PAM ($89,5 \pm 2,3$ mmHg) (Figura 13).

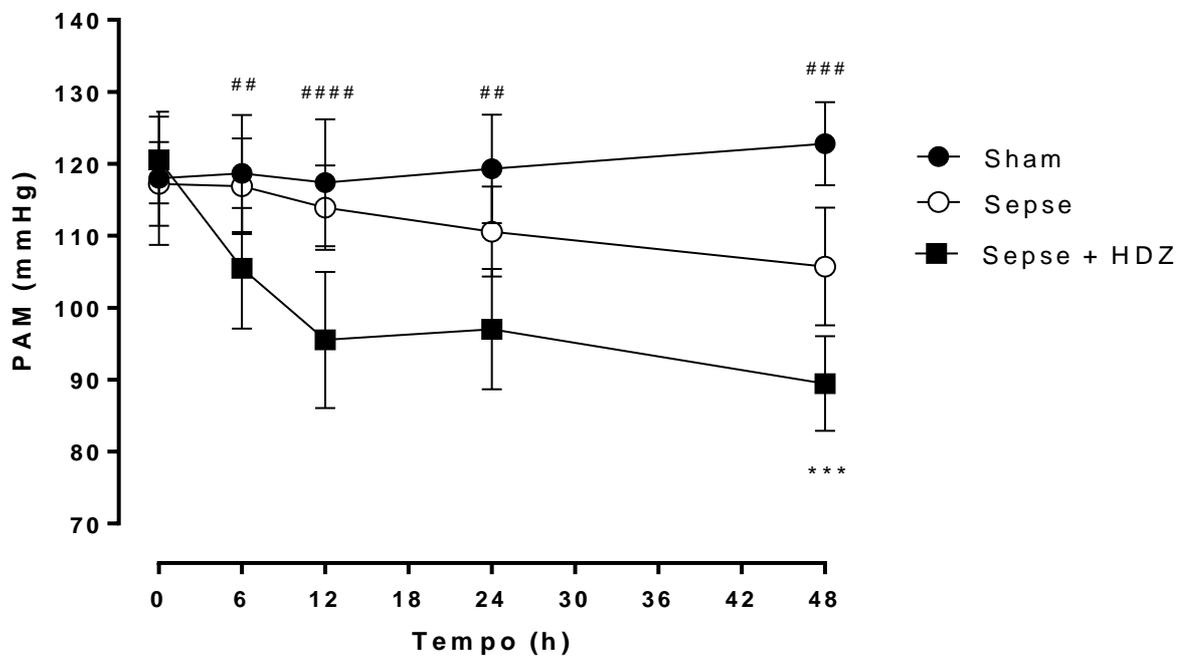


FIGURA 13: Pressão arterial média (PAM) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os valores representam a média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 5 - 10$). *** $p < 0,001$ vs grupo sham. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs grupo sepse. HDZ, hidralazina.

Semelhante à PAM, os valores basais de FC para os grupos sham, sepse e sepse + HDZ não foram significativamente diferentes entre si ($368,7 \pm 6,6$; $361,2 \pm 7,0$; $368,3 \pm 3,4$ bpm, respectivamente). Após 48h, entretanto, os animais do grupo sham mantiveram seus valores próximos ao basal ($401,4 \pm 6,2$ bpm), enquanto a FC dos animais dos grupos sepse e sepse + HDZ aumentou significativamente ($456,5 \pm 12,3$ e $485,6 \pm 16,2$ bpm) (Figura 14).

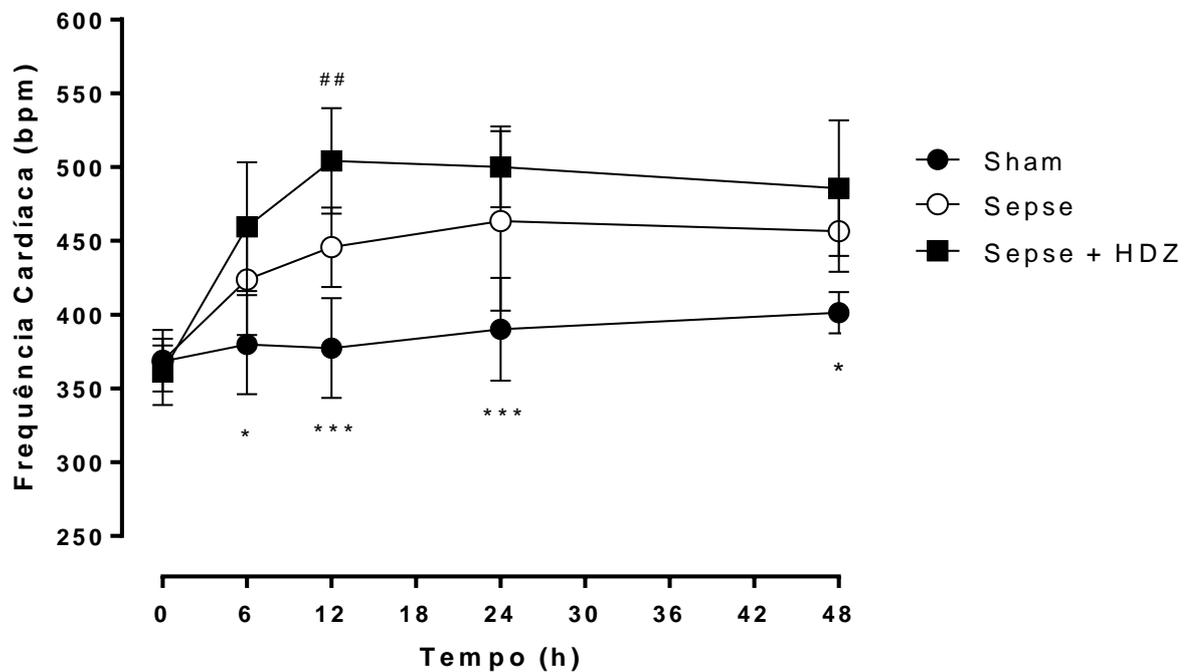


FIGURA 14: Frequência cardíaca dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os valores representam a média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 5 - 10$). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs grupo sham. ## $p < 0,01$ vs grupo sepse. HDZ, hidralazina.

Os valores basais da PAS e PAD para os grupos sham, sepse e sepse + HDZ não foram significativamente diferentes entre si. Após 48h, entretanto, os animais dos grupos sham mantiveram seus valores próximos ao basal ($135,9 \pm 3,7$; $100,5 \pm 2,8$ mmHg, respectivamente), enquanto a PAS e PAD dos animais dos grupos sepse e sepse + HDZ reduziu significativamente ($122,9 \pm 5,7$; $87,8 \pm 3,4$ e $114,7 \pm 5,3$; $74,12 \pm 3,0$ mmHg, respectivamente) (Figura 15).

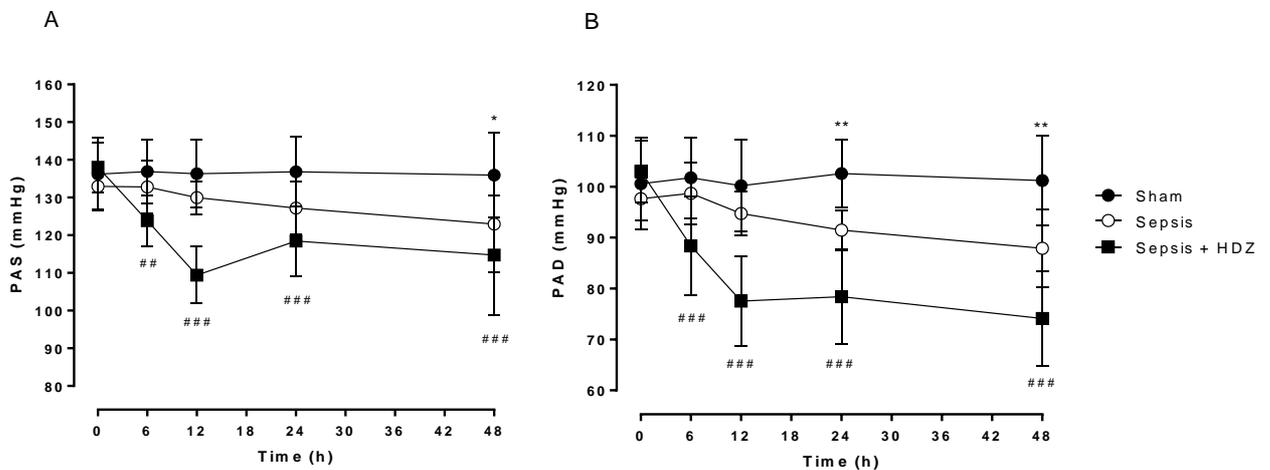


Figura 15: Pressão arterial sistólica (A) e diastólica (B) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os valores representam a média \pm EPM. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey (n = 5 - 10). *p < 0,05 e **p < 0,01 vs grupo sham; ## p < 0,01 e ###p < 0,001 vs grupo sepse. HDZ, hidralazina.

5.7 Efeito da HDZ nas concentrações séricas de citocinas

As concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram significativamente maiores no grupo sepse ($10,2 \pm 0,3$; $99,1 \pm 10,7$; $1252 \pm 325,3$ pg/mL, respectivamente) quando comparados ao grupo sham ($4,5 \pm 0,5$; $45,7 \pm 15,8$; $197 \pm 86,3$ pg/ml). A administração com HDZ preveniu esse aumento ($4,1 \pm 0,4$; $19,66 \pm 4,5$; $267 \pm 138,1$ pg/mL) (Figura 16 A, B e C).

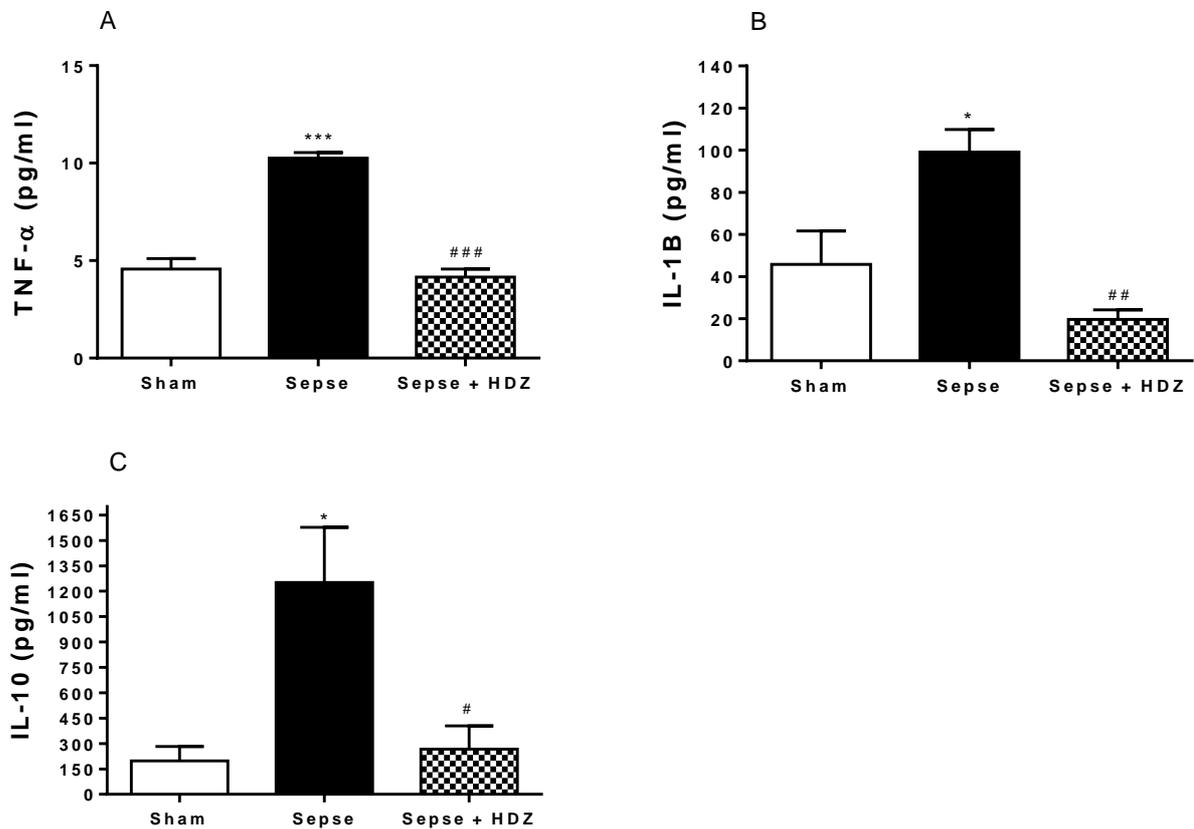


FIGURA 16: Efeito da hidralazina nas concentrações séricas de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-10 (C) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 8$). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs grupo sham. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs grupo sepse. HDZ, hidralazina; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IL, interleucina.

5.8 Efeito da HDZ sobre a atividade da MPO

A Figura 17 demonstra o efeito da administração com HDZ na atividade da MPO no baço, fígado e rim. No grupo sepse, a atividade da MPO estava significativamente aumentada em todos os órgãos analisados (baço: $26,02 \pm 2,74$; fígado: $0,11 \pm 0,01$; rim: $0,20 \pm 0,02$ U/g), quando comparada aos valores do grupo sham ($11,35 \pm 1,93$; $0,054 \pm 0,009$; $0,10 \pm 0,01$ U/g, respectivamente). A administração com HDZ foi capaz de reduzir significativamente a atividade da enzima MPO ($13,37 \pm 0,95$; $0,066 \pm 0,007$; $0,141 \pm 0,006$ U/g, respectivamente) em todos os órgãos.

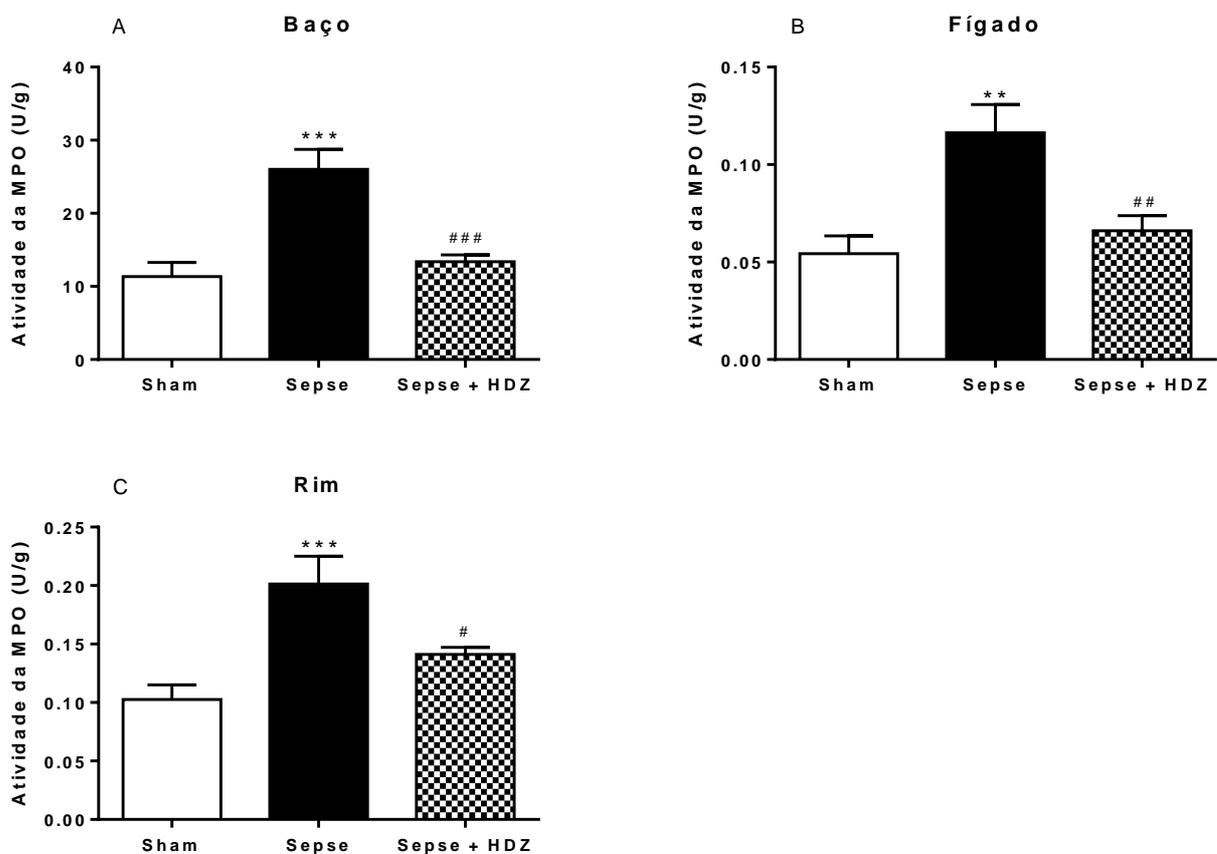


FIGURA 17: Efeito da hidralazina na atividade da mieloperoxidase no baço (A), fígado (B) e rim (C) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os dados são expressos como média \pm EPM e analisados por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 8$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs grupo sham. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs grupo sepse. HDZ, hidralazina; MPO, mieloperoxidase.

5.9 Efeito da HDZ sobre o dano oxidativo

As Figuras 18 a 20 mostram os efeitos da sepse e HDZ no dano oxidativo em lipídios, proteínas carboniladas e integridade de grupos sulfidrilas no baço (A), fígado (B) e rim (C) de grupos sham, sepse e sepse + HDZ. As concentrações de TBARS aumentaram significativamente em todos os órgãos do grupo sepse (baço: $2,33 \pm 0,15$; fígado: $0,92 \pm 0,15$; rim: $9,14 \pm 0,97$ nmol/mg de proteína), quando comparados ao sham ($1,41 \pm 0,05$; $0,23 \pm 0,01$; $3,83 \pm 0,39$ nmol/mg de proteína, respectivamente). Ao administrar a HDZ, pode-se perceber que ocorre uma redução significativa nesses parâmetros ($1,47 \pm 0,07$; $0,48 \pm 0,06$; $4,34 \pm 0,36$ nmol/mg de proteína, respectivamente), quando comparado ao grupo sepse (Figura 18).

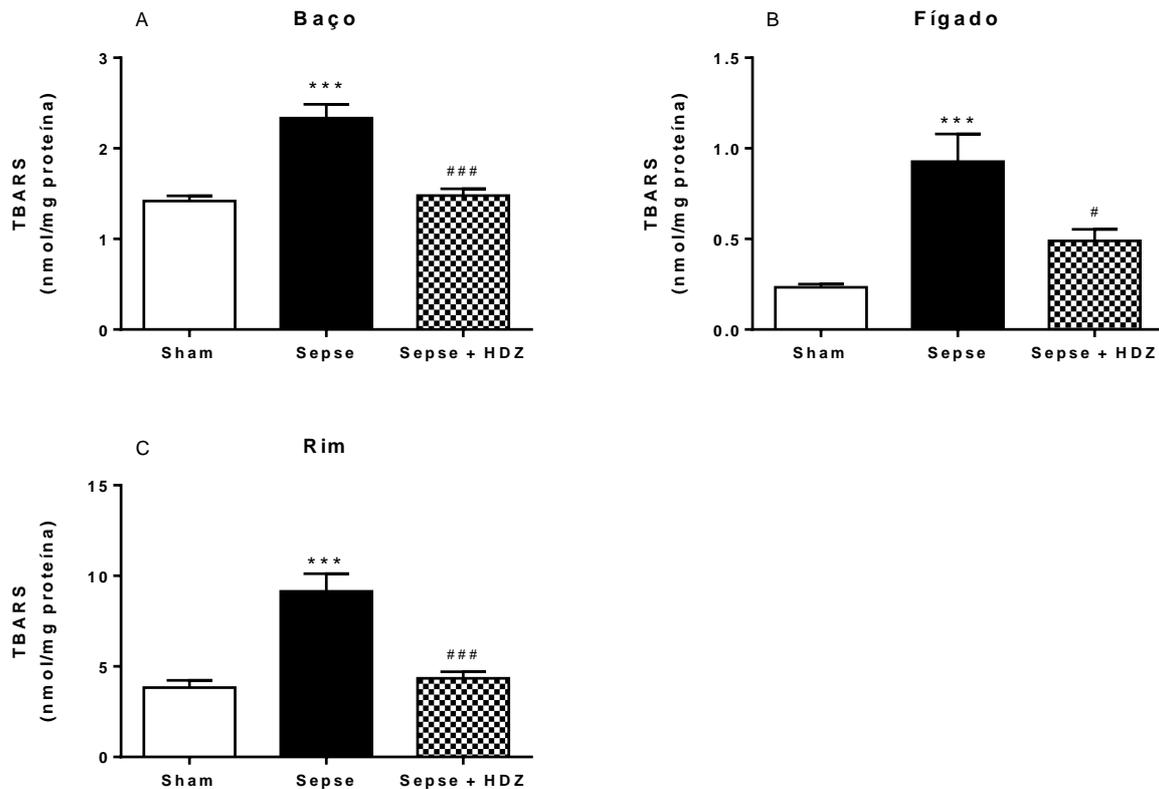


FIGURA 18: Efeito da hidralazina em espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no baço (A), fígado (B) e rim (C) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 8$). *** $p < 0,001$ vs grupo sham; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs grupo sepse.

Conforme mostrado na Figura 19 (A, B e C), a concentração da carbonilação de proteínas nos três órgãos estudados foram significativamente aumentados no grupo sepse ($1,52 \pm 0,19$; $18,57 \pm 2,47$; $17,47 \pm 1,21$ nmol/mg de proteína, respectivamente), quando em comparação com o sham ($0,58 \pm 0,08$; $7,31 \pm 1,10$; $7,02 \pm 1,33$ nmol/mg de proteína, respectivamente). O grupo sepse + HDZ, entretanto, exibiu redução significativa desse parâmetro ($0,76 \pm 0,08$; $6,33 \pm 0,77$; $7,91 \pm 0,81$ nmol/mg de proteína).

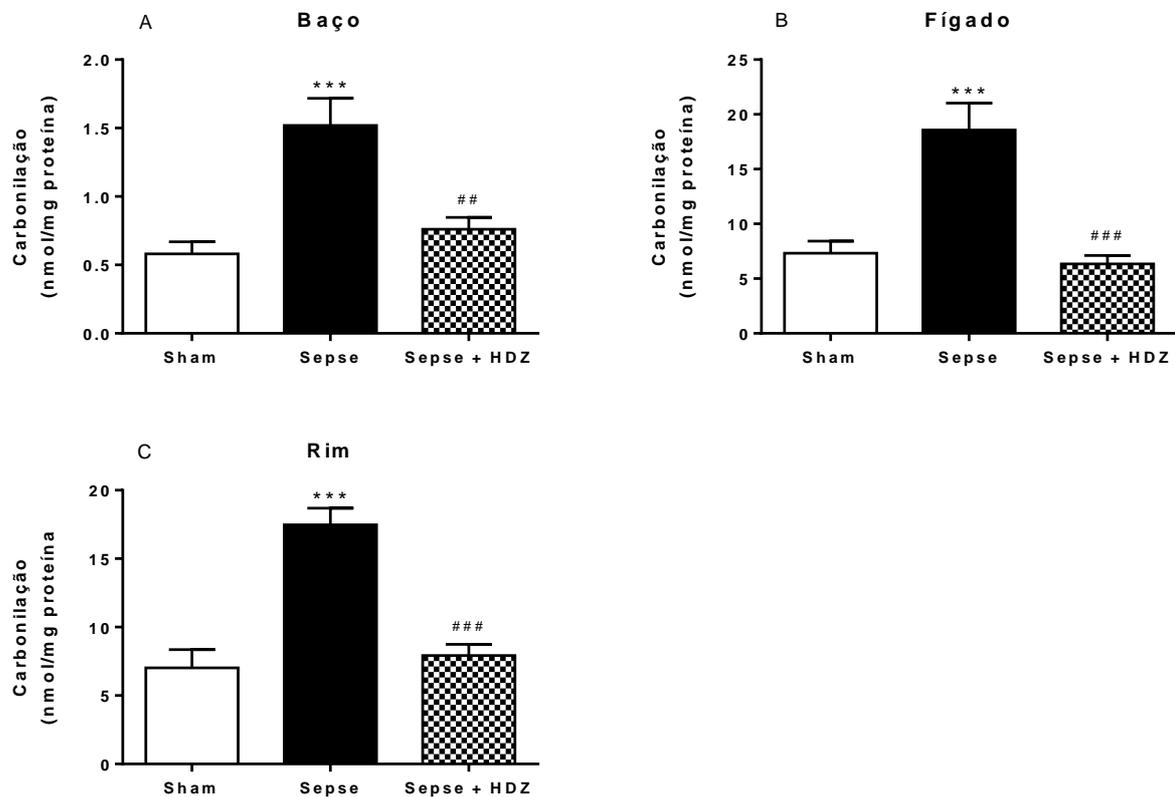


FIGURA 19: Efeito da hidralazina na carbonilação de proteínas no baço (A), fígado (B) e rim (C) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 8$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs sham; ## $p < 0,01$, e ### $p < 0,01$ vs sepse. HDZ, hidralazina.

Em relação à oxidação dos grupamentos sulfidrilas (Figura 20 A, B e C), notou-se que os animais do grupo sepse tiveram redução significativa no conteúdo de proteínas sulfidrilas no baço, fígado e rim ($28,95 \pm 2,03$; $41,64 \pm 3,97$; $45,13 \pm 2,14$ nmol/mg de proteína, respectivamente), quando comparado ao sham ($45,48 \pm 1,94$; $66,61 \pm 4,64$; $60,08 \pm 4,53$ nmol/mg de proteína, respectivamente). Essa redução foi prevenida após a administração com a HDZ ($47,17 \pm 1,46$; $67,97 \pm 4,28$; $61,47 \pm 6,35$ nmol/mg de proteína, respectivamente).

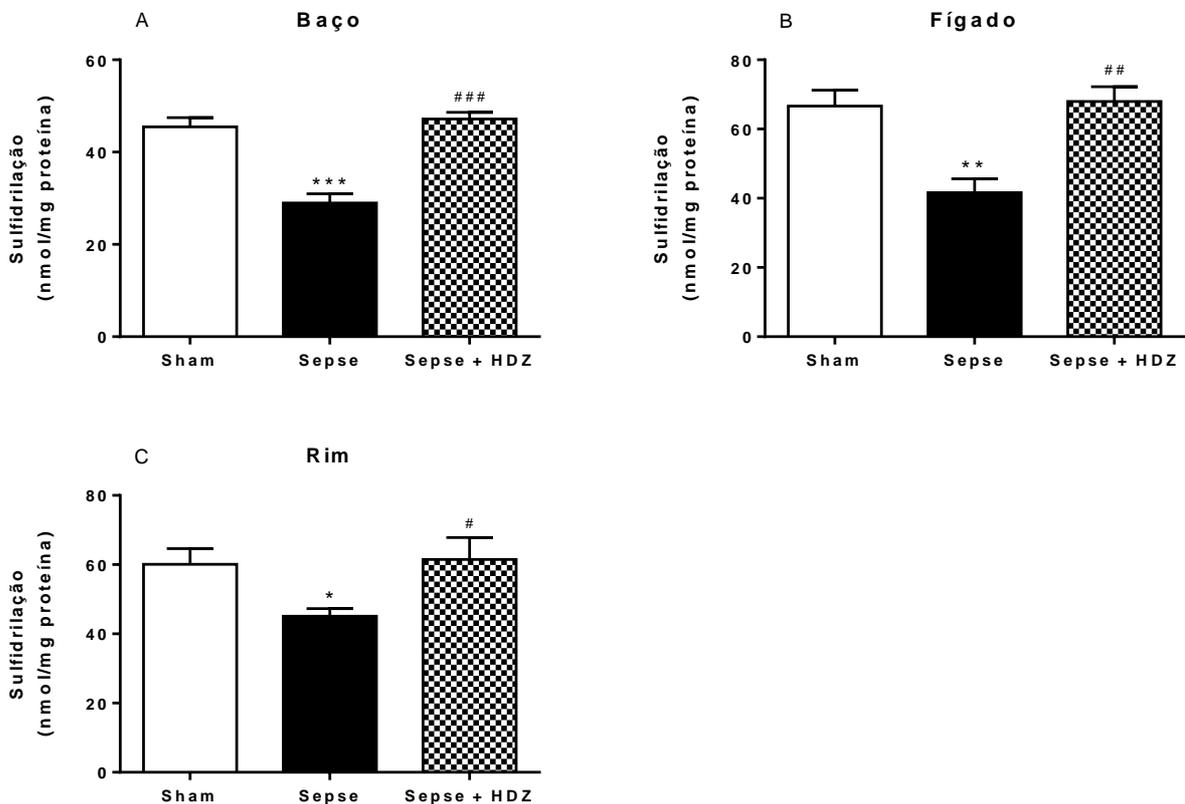


FIGURA 20: Hidralazina previne a sufidrilção de proteínas no baço (A), fígado (B) e rim (C) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 8$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs grupo sham. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs grupo sepse. HDZ, hidralazina.

5.10 Efeito da HDZ na atividade das enzimas CAT e SOD

As atividades das enzimas CAT e SOD no baço, fígado e rim foram medidas e estão representada nas Figuras 21 e 22 (A, B e C). A atividade da CAT foi significativamente reduzida em todos os órgãos (baço: $7,24 \pm 1,16$; fígado: $77,35 \pm 8,46$; e rim: $29,20 \pm 2,68$ U/mg de proteína) dos animais do grupo sepse, quando comparado ao sham ($15,16 \pm 0,88$; $182,4 \pm 15,4$; $84,14 \pm 21,97$ U/mg de proteína, respectivamente). A administração com HDZ melhorou a atividade da CAT apenas no baço ($16,57 \pm 2,27$ U/mg de proteína), mas não no fígado ou rim (Figura 21 A, B e C).

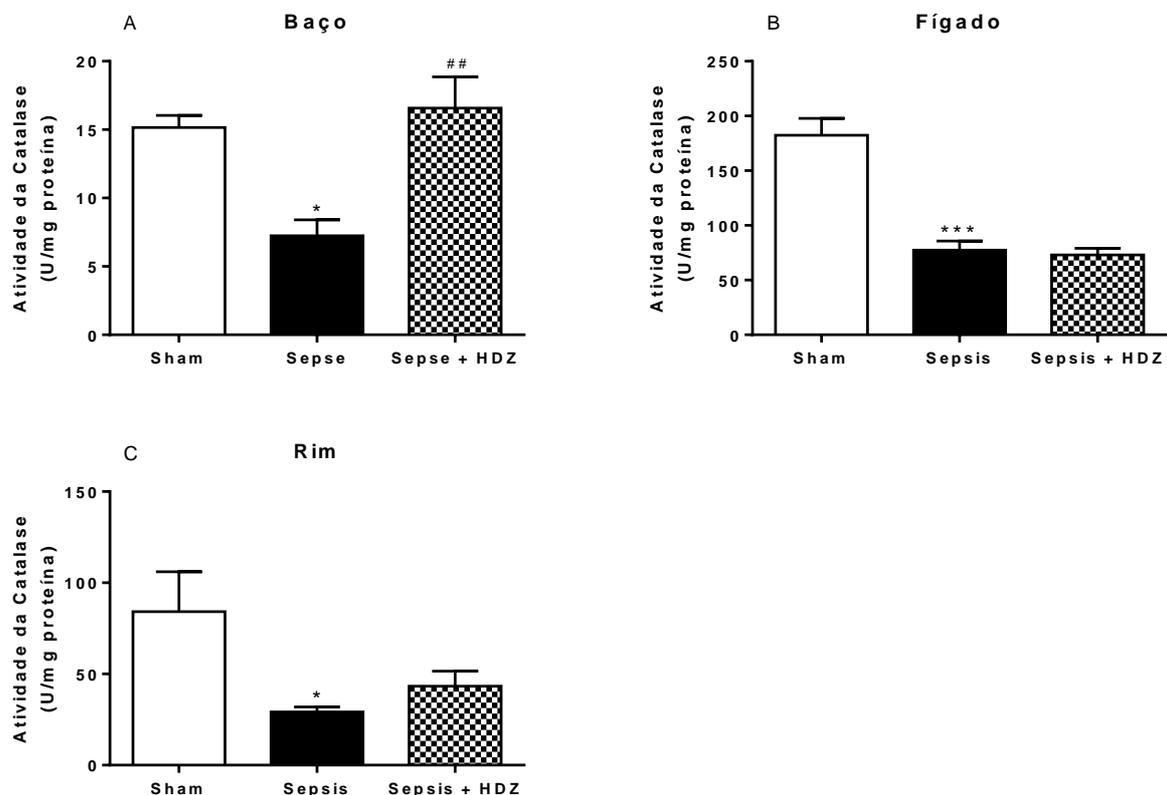


FIGURA 21: Efeito da hidralazina (HDZ) na atividade da enzima catalase (CAT) no baço (A), fígado (B) e rim (C) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ($n = 8$). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs grupo sham. ## $p < 0,01$ vs grupo sepse.

A atividade da SOD também foi significativamente reduzida nos três órgãos (baço: $16,25 \pm 2,37$; fígado: $3,504 \pm 0,9245$; rim: $8,633 \pm 1,17$ U/mg de proteína) dos animais no grupo sepse quando comparados ao grupo sham ($27,95 \pm 2,09$; $15,15 \pm 2,155$; $16,39 \pm 1,359$ U/mg de proteína, respectivamente). A administração com HDZ melhorou a atividade da enzima SOD no baço e no fígado ($29,15 \pm 4,03$; $11,71 \pm 2,488$ U/mg de proteína), mas não no rim (Figura 22 A, B e C).

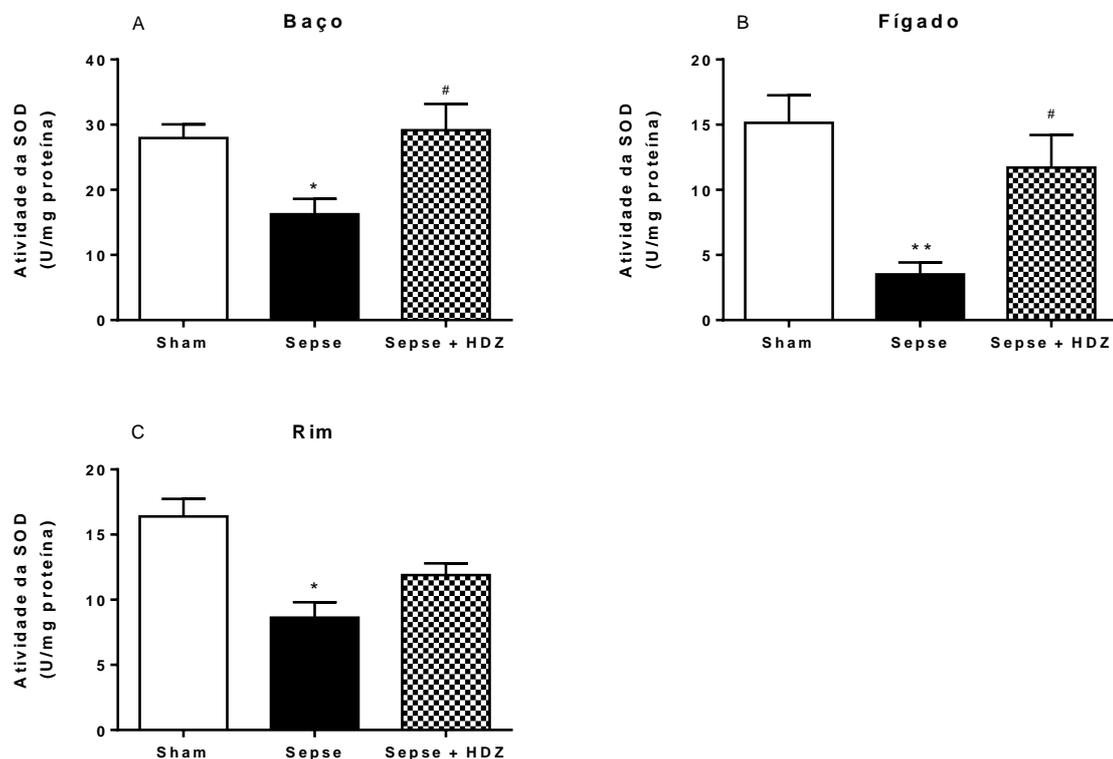


FIGURA 22: Efeito da hidralazina (HDZ) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no baço (A), fígado (B) e rim (C) de animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. Os dados são expressos como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey ($n = 8$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs grupo sham. # $p < 0,05$ vs grupo sepse.

5.11 Efeito da HDZ na via de sinalização PI3K/Akt na sepse

A Figura 23 demonstra os efeitos da administração com HDZ na via de sinalização PI3K/Akt no baço, fígado e rim. Como pode ser visto, a sepse promoveu um aumento acentuado na ativação da Akt no fígado e rim ($1,66 \pm 0,33$ e $1,91 \pm 0,29$ r.s., respectivamente) quando comparada ao grupo sham ($0,92 \pm 0,07$; $1,00 \pm 0,07$ r.s.). Este aumento foi prevenido após administrar a HDZ ($0,74 \pm 0,12$; $1,18 \pm 0,08$ r.s.). Por outro lado, no baço, a ativação de Akt não foi aumentada em ambos os grupos sepse ou sepse + HDZ ($0,65 \pm 0,02$ r.s. e $0,96 \pm 0,095$ r.s., respectivamente), quando comparado ao grupo sham ($1,00 \pm 0,03$ r.s.)

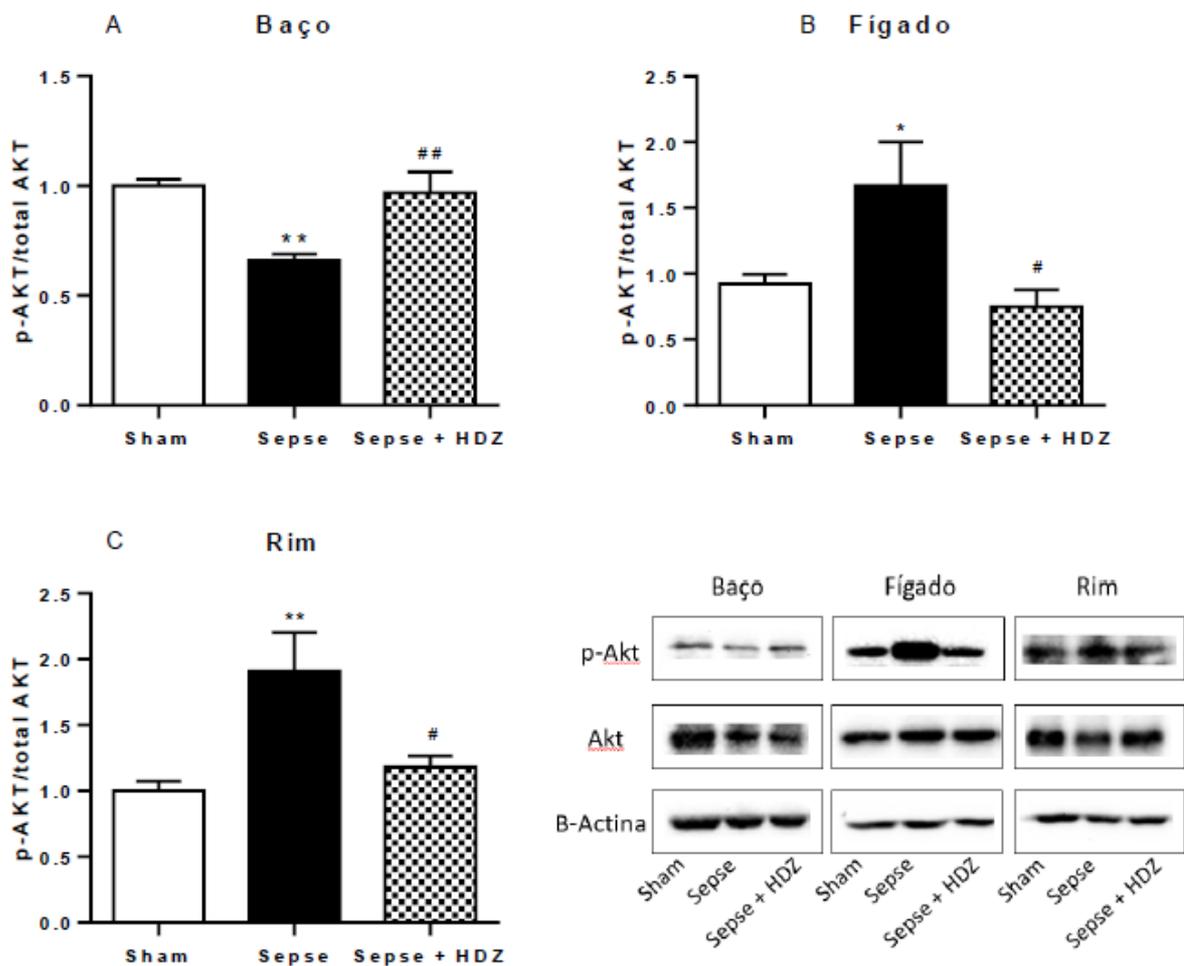


FIGURA 23: Efeito da hidralazina sobre a atividade da Akt no baço (A), fígado (B) e rim (C) dos animais dos grupos sham, sepse e sepse + HDZ. A razão Akt total e p-Akt foram normalizados como proporções para β -actina, que foi usada como um controle de carregamento. Blots representativos para Akt total e p-Akt em tecidos de baço, fígado e rim de rato 48 h após o procedimento CLP. Os dados são expressos como médias \pm EPM e analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey ($n =$

6). * p <0,05 e ** p <0,001 vs grupo sham. #p <0,05 e ###p <0,01 vs o grupo sepse. HDZ, hidralazina; Akt, Proteína Cinase B; CLP, ligadura e perfuração do ceco.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que a administração da HDZ (1mg/kg), uma conhecida e potente substância vasodilatadora, em animais com sepse durante as 48 h estudadas promoveu um efeito benéfico, uma vez que: (1) aumentou a sobrevivência, (2) melhorou a gravidade da sepse, (3) diminuiu as concentrações do lactato, um biomarcador importante e que na sepse está relacionado com o prognóstico do paciente, (4) preveniu a hipotermia, (5) preveniu a hipoglicemia, (6) reduziu os danos oxidativos aos lipídios e às proteínas, (7) aumentou as defesas antioxidantes, através da atividade das enzimas CAT e SOD, (8) reduziu a concentração dos parâmetros relacionados a inflamação (MPO e citocinas) e (9) reduziu a ativação da via de sinalização PI3K/Akt.

A sepse foi induzida pelo método CLP por ser o modelo polimicrobiano mais utilizado em estudos de sepse em animais e que tipicamente mimetiza a sepse intra-abdominal em humanos (DEJAGER et al., 2011; WICHTERMAN et al., 1980). Como esperado, a indução da sepse foi capaz de causar condições clínicas mais críticas e severas quando comparados aos animais que compuseram o grupo sham, demonstrando assim a validação do modelo utilizado. Os animais com sepse apresentaram hipotermia, prejuízo no controle glicêmico, elevação nos níveis do lactato, hipotensão, maior escore clínico de sepse e menor taxa de sobrevivência. Esses achados estão em concordância com outros estudos que avaliaram parâmetros semelhantes usando o método de indução CLP e, em conjunto, podem ser considerados como um forte indicador de sucesso na indução da sepse (KOKKINAKI et al., 2019; LIN et al., 2019; RITTIRSCH et al., 2009). Interessantemente, a administração com a HDZ foi capaz de prevenir alterações em quase todos os parâmetros avaliados nesse estudo.

No presente estudo, a hipotermia observada em animais sépticos foi evitada após a administração com a HDZ. Sabe-se que a hipotermia é um indicador de prognóstico negativo, estando associada ao aumento da mortalidade e falência múltipla de órgãos (DREWRY et al., 2015). É um preditor clínico precoce de imunossupressão induzida por sepse, tanto em humanos quanto em animais e, até o

momento, o mecanismo subjacente aos efeitos prejudiciais da hipotermia ainda não é conhecido (DREWRY et al., 2015; LAITANO et al., 2018).

O grupo sepse apresentou perda de massa corporal significativamente maior quando comparado ao grupo sham. Sabe-se que a exposição a situações estressantes pode influenciar o comportamento alimentar e alterar o peso corporal dos animais (DE SOUZA et al., 2020; GARCIA et al., 2009). No entanto, a administração com HDZ não foi capaz de reverter essa perda.

É relatado que o desequilíbrio no metabolismo da glicose é uma condição comum presente nos casos de infecção, assim como na sepse (TSAI et al., 2011). Estudos realizados em ratos com sepse, utilizando o modelo CLP, observaram hipoglicemia já nas primeiras horas após a indução (SOUSA et al., 2019) e permaneceu no decorrer das próximas 24 h (VALLEJOS et al., 2019). Em concordância com a literatura, os resultados do presente estudo mostraram que as concentrações de glicemia foram significativamente menores do que os animais do grupo sham. Notavelmente, essa mudança não foi observada em animais tratados com HDZ. Essa redução na glicose sanguínea, encontrada no grupo sepse, parece ser causada pela alta captação de glicose por tecidos ricos em macrófagos (SOUSA et al., 2019). Geralmente, na fase de hipoglicemia causada pela sepse, ocorre redução da respiração mitocondrial e da produção de ATP. Essas também são indicações da gravidade do processo infeccioso (LEWIS et al., 2016; SOUSA et al., 2019). Portanto, é possível que a redução da glicemia esteja implicada em alta morbimortalidade no grupo sepse. Assim como a glicemia, alguns outros biomarcadores podem ser utilizados para avaliar a resposta do paciente à infecção por sepse. Entre eles, podemos citar o lactato sanguíneo, que é um marcador de microcirculação anormal, principalmente devido à hipoperfusão tecidual e hipóxia celular (KIM et al., 2013).

A hiperlactatemia pode ser considerada um marcador razoável de gravidade da sepse, uma vez que concentrações mais elevadas estão relacionadas a maior mortalidade (GOTMAKER et al., 2017). Estudos clínicos e experimentais mostraram que concentrações menores de lactato sérico estão positivamente correlacionadas com uma melhora em humanos e animais com sepse (CHERTOFF et al., 2015; XU et al., 2019). Pelos resultados do presente estudo, os animais do grupo sepse apresentaram maiores concentrações de lactato do que os animais do grupo sham,

sugerindo um quadro de hipóxia generalizada dos tecidos, ocasionando disfunções orgânicas e conseqüentemente a morte. Esse aumento também foi encontrado nos estudos de Zheng et al, (2017) e Takakura et al, (2019). Curiosamente, quando tratado com HDZ, esse aumento foi prevenido e os valores permaneceram próximos ao encontrado no grupo sham, sugerindo assim uma atuação da HDZ na melhora da microcirculação.

Uma outra complicação comum na sepse é a hipotensão, responsável pelo aumento da mortalidade, e a hipotensão refratária ao tratamento é necessária para o diagnóstico de choque séptico (MAHESHWARI et al., 2018; SINGER et al., 2016). No presente estudo foi possível observar que o grupo sepse foi apresentando uma queda na PAM e uma elevação na FC no decorrer das 48 h avaliadas, em relação ao grupo sham, sendo comum de acontecer no modelo CLP (HOFFMAN et al., 2020). Já o grupo sepse + HDZ, apresentou um maior efeito hipotensor na PAM e da FC. A hidralazina é um vasodilatador direto que atua diretamente nas arteríolas e o seu mecanismo de ação é relaxar a musculatura lisa arterial, conseqüentemente reduzindo a resistência vascular periférica e a pressão arterial (OSTRYE et al., 2014). O tratamento com hidralazina aumenta a frequência cardíaca e o débito cardíaco (DILLMAN, ANDERS e MOFFETT, 2016). Os mecanismos com o qual a hidralazina promove essa ação ainda não estão muito bem esclarecidos, mas sabe-se que incluem a inibição da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático pelo inositol trifosfato (IP3) e a inibição da fosforilação da miosina, impedindo a contração da musculatura lisa vascular e, conseqüentemente, levando à vasodilatação (FLYNN et al., 2016; MCCOMB et al., 2016).

A sepse causa uma disfunção a nível da microcirculação, conseqüentemente menos oxigênio chega aos tecidos e às células, interferindo negativamente nos processos celulares, como por exemplo, na respiração celular nas mitocôndrias. Havendo então um quadro de anaerose com aumento da produção do lactato. Esses efeitos da HDZ na glicemia e no lactato podem estar relacionados com uma melhora a nível da microcirculação. Em estudo realizado por Santos et al., (2019), os autores mostraram uma associação estatisticamente significativa entre má perfusão periférica e alta mortalidade na sepse. A monitoração da macrocirculação e a recuperação das funções vitais permanecem como os pilares do manejo na sepse. Evidências importantes mostraram que a perfusão prejudicada de órgãos ou tecidos periféricos

não vitais, como a mucosa sublingual, os músculos e a pele, estão associadas a uma piora da falência de órgãos (SANTOS et al., 2019).

Ademais, a perfusão em órgãos ou tecidos não vitais se deteriora mais cedo, apresenta taxas de normalização acentuadamente diferentes e persiste mesmo após a correção dos parâmetros de macrocirculação sistêmica (LIMA; BAKKER, 2014). Esse fenômeno, na literatura, é conhecido como dissociação entre macrocirculação e microcirculação (HERNANDEZ; TEBOUL, 2016). Vários relatos experimentais, *in vivo* e *in vitro*, mostraram que os distúrbios da microcirculação e a hipoperfusão na sepse afetaram todos os sítios estudados, inclusive órgãos vitais e não vitais, como pele, músculo, olho, língua, intestino, fígado, coração e até o cérebro (DE BACKER et al., 2014). Entre os sinais fisiopatológicos desse fenômeno estão as lesões por estresse oxidativo/nitrosativo, a disfunção endotelial e a desregulação vasomotora (INCE, 2015).

Embora a sepse apresente um quadro de patogênese diversa, vale destacar a cascata inflamatória como um componente importante, uma vez que distúrbios imunológicos podem levar à liberação exacerbada de citocinas, assim como de mediadores inflamatórios após a infecção, resultando em uma lesão autoimune (WANG et al., 2016). Nessa inflamação descontrolada, há um grande aumento nas concentrações de citocinas pró (IL-1 α , IL-1 β ; IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10), que são produzidas por neutrófilos ativados, monócitos e linfócitos B (KOKKINAKI et al., 2019; KULKARNI et al., 2018; MICHELS et al., 2015). Portanto, as concentrações de citocinas na sepse estão diretamente relacionadas ao prognóstico (ZHANG; HE, 2018). Avaliando as concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-10, foi possível observar que todos estavam aumentados nos animais com sepse, quando comparados ao grupo sham, corroborando assim achados anteriores (BEDIRLI et al., 2018; KOKKINAKI et al., 2019, LIN et al., 2019; TAKAKURA et al., 2019).

Estudos relatam que existe uma correlação negativa entre as concentrações séricas de TNF- α e IL-1 β e as taxas de sobrevivência. Walley et al., (1996) relatam o papel vital que mediadores inflamatórios, como IL-1 β , desempenham na gravidade e mortalidade da sepse em murinos. Okusawa et al., (1988) demonstraram que o estado de choque séptico pode ser induzido pela administração de IL-1 β em coelhos. Além disso, uma deficiência na produção de IL-1 β foi capaz de causar proteção em ratos

contra o desenvolvimento de choque séptico (ZHENG et al., 1995).

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória e pode inibir a resposta imune do tipo Th1 ao inibir a proliferação de células Th1 e a produção de IL-2 e IFN- γ (KANG et al., 2016). Além disso, Kulkarni et al., (2018) mostraram um aumento significativo na frequência e número de células B que expressam IL-10 em camundongos sépticos e Song et al., (1999) demonstraram que IL-10 está envolvida na disfunção imune em animais sépticos. Esses relatos sugerem que as concentrações circulantes de IL-10 estão aumentadas na sepse.

Para avaliar se a HDZ era capaz de alterar o perfil inflamatório na sepse, as concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram medidos nas amostras de sangue de todos os grupos experimentais. Os resultados mostraram que os níveis dessas citocinas apresentaram-se aumentadas nos animais com sepse, quando comparados aos do grupo sham, corroborando dados de Shrum et al., (2014), Kokkinaki et al., (2019) e Takakura e Zandi-Nejad (2019). Por outro lado, a administração com HDZ preveniu esse aumento, sugerindo que essa substância esteja atuando inibindo o processo de inflamação na sepse.

A atividade anti-inflamatória da HDZ já havia sido relatada anteriormente. Xu et al., (2006), mostraram que a HDZ reduziu a concentração de TNF- α em células mononucleares do sangue periférico e aumentou a IL-10 em mulheres grávidas. Outro estudo de Xu et al., (2007), demonstrou que a HDZ reduziu a concentração de IL-10, TNF- α e IL-6 no tecido placentário de mulheres grávidas com pré-eclâmpsia. Além disso, Rodrigues et al., (2008), observaram que a HDZ foi capaz de reduzir a migração de leucócitos em ratos hipertensos e normotensos.

As citocinas têm a capacidade de regular várias respostas inflamatórias, uma das quais é a migração de células do sistema imunológico para o local da infecção. Como os neutrófilos são as principais células do sistema imune inato, constituem a primeira linha de defesa, pois são rapidamente recrutados para o local da infecção ou inflamação devido às suas inúmeras funções antimicrobianas, como fagocitose, citólise pela geração de ERRO e liberação de peptídeos e enzimas antimicrobianas (MISHRA et al., 2017). Esses neutrófilos, em resposta a processos inflamatórios, aumentam a expressão da MPO, com o objetivo de catalisar a conversão de íon

cloreto (Cl⁻) e H₂O₂ a ácido hipocloroso (HOCl), um oxidante de extrema toxicidade (KUBOTA et al., 2012). MPO é uma enzima antimicrobiana abundante e um biomarcador de migração de neutrófilos, inflamação (BEDIRLI et al., 2018) e estresse oxidativo (XIA et al., 2019). Nesse contexto, testou se a HDZ também poderia melhorar a concentração da MPO. Assim, observou-se que a sepse aumentou significativamente a atividade dessa enzima no baço, fígado e rim, corroborando estudos anteriores (BEDIRLI et al., 2018; REIS et al., 2017) e a administração de HDZ, entretanto, preveniu a atividade da MPO, possivelmente por impedir a migração de neutrófilos e, conseqüentemente, a resposta inflamatória.

A literatura tem demonstrado de maneira consistente que durante o desenvolvimento fisiopatológico da sepse ocorre um desequilíbrio entre os processos oxidativos e antioxidantes, resultando em um aumento de radicais livres e outros metabólitos ativos, que podem causar danos às estruturas celulares e teciduais (KARDEŞ et al., 2018; ZHOU et al., 2019). Esse estresse oxidativo produz um aumento excessivo da produção de ERO e ERN, e uma redução da capacidade antioxidante endógena, o que conseqüentemente gera um acúmulo de dano oxidativo às células (SOUSA et al., 2019). Assim, o dano oxidativo causado pela sepse em lipídios e proteínas, bem como a capacidade da HDZ em inibir esse dano foram avaliados no presente estudo.

O dano oxidativo aos lipídios foi avaliado por meio de substâncias reativas ao TBARS, que são formadas como um subproduto da peroxidação lipídica. O teste consiste em avaliar as concentrações de malondialdeído (MDA) presente na amostra, bem como os gerados a partir de hidroperóxidos lipídicos. O MDA é um aldeído altamente ativo, o produto final da peroxidação lipídica induzida por radicais livres e metabólitos ativos (HITCHON; ELGABALAWY, 2004; MATEEN et al., 2016). Foram avaliadas as concentrações de TBARS no baço, fígado e rim e foi possível perceber que nos animais com sepse, essas foram maiores em todos os órgãos estudados, mostrando que as membranas lipídicas desses tecidos são alvos importantes para as ERO e, alterações nos lipídios da membrana, acarretam em conseqüências na permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas.

Além da peroxidação lipídica, os radicais livres podem oxidar aminoácidos, resultando na formação de grupos carbonila, tióis oxidados, entre outras modificações

que alteram a função e a estrutura normal da proteína. A geração dos grupos carbonila e sulfidrilas são usados como marcadores de oxidação de proteínas mediada por radicais livres. Assim, o aumento das carbonilação e a diminuição da sulfidrilção indicam dano oxidativo a proteínas nos animais com sepse. Essas alterações podem levar a perda da atividade biológica das funções proteicas (STECKERT et al., 2014). O dano oxidativo nas proteínas foi determinado pela medição da formação de grupos carbonila. Foi observado que os animais com sepse apresentaram aumento do dano proteico. Em relação à integridade dos grupos sulfidrilas, notou-se que os animais do grupo sepse apresentaram redução no teor de proteína sulfidrilas. Os resultados encontrados reforçam as evidências de que a sepse altera a estrutura lipídica e proteica em vários órgãos (PETRONILHO et al., 2015; PETRONILHO et al., 2016), por aumentar as concentrações de TBARS e proteínas carboniladas, além de reduzir a integridade dos grupos sulfidrilas. Esses danos causados aos lipídios e às proteínas foram melhorados, nos animais que foram induzidos a sepse e receberam a administração da HDZ.

Resultados semelhantes foram encontrados por Guo et al., (2019), que relataram que a HDZ também foi capaz de suprimir o aumento de MDA, em um modelo da doença de Parkinson em ratos, através do fator 2 relacionado ao fator nuclear E2 (Nrf2). O autor destaca que uma regulação negativa de Nrf2 torna os neurônios dopaminérgicos suscetíveis a danos por estresse oxidativo, enquanto a ativação de Nrf2 confere proteção ao tecido. Também é provável que a hidralazina ative a via Nrf2 através de outras vias, por exemplo, fator nuclear kappa B (NF-kB) e via PI3K/Akt, que são relatados para interagir com elementos Nrf2. Os autores destacam ainda que o tratamento apenas com a HDZ aumentou a translocação nuclear de Nrf2 e elevou a transcrição do gene para elementos de resposta antioxidante mediada por Nrf2 *in vitro* e *in vivo*. Mas o mecanismo para esse efeito permanece indefinido. É possível que Nrf2 tenha sido modificado pela hidralazina de uma forma que interrompeu a interação Nrf2: Keap1, o que então permitiu que ele se translocasse para o núcleo onde se ligava aos elementos de resposta antioxidante.

Além do dano oxidativo, é frequentemente observada uma diminuição da atividade da enzima antioxidante CAT em diferentes órgãos após a indução da sepse (FENG et al., 2019; SOUSA et al., 2019). A CAT atua catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio e água. Essa enzima pode ser encontrada

em concentrações mais elevadas no fígado, rim e eritrócitos (KODYDKOVÁ et al., 2014). Esse estudo observou que, devido ao estresse oxidativo causado pela sepse, a atividade da enzima CAT no baço, fígado e rim foi significativamente reduzida. Nishikawa et al., (2009) relata que a regulação da expressão do gene CAT desempenha um papel importante nos níveis de catalase. A expressão desse gene é regulada por vários mecanismos, dentre eles, o TNF- α .

Feng et al, (2019) demonstraram que a sepse induzida por LPS em ratos causou danos oxidativo nos tecidos renais ao reduzir as concentrações de enzimas antioxidantes como GSH, SOD e CAT (FENG et al., 2019). A SOD catalisa a conversão do radical superóxido ($O_2 \bullet$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As enzimas CAT e GPx atuam prevenindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio, convertendo-o em H_2O e O_2 (VINCENT et al., 2007).

Por outro lado, a administração com a HDZ atenuou os efeitos da sepse por aumentar a atividade da enzima CAT no baço. Este achado sugere que HDZ pode estar agindo por meio de um mecanismo de proteção, diminuindo a produção de ERO e mantendo o equilíbrio redox. Este efeito, entretanto, não foi observado nos tecidos do fígado e rim. Talvez, pelo tempo da administração com a HDZ, não sendo suficiente para causar uma melhora na resposta da enzima CAT nesses órgãos. Assim, são necessários novos experimentos para avaliar melhor o efeito do HDZ sobre as enzimas antioxidantes desses dois órgãos. Em consonância com esses achados, Maheshwari et al (2010) e Guo et al (2019) observaram que a HDZ foi capaz de proteger as células cultivadas *in vitro* da citotoxicidade causada pelo H_2O_2 , reforçando sua atividade antioxidante. Esses resultados indicam que a HDZ melhorou os danos causados pela sepse, potencialmente devido aos efeitos anti-inflamatórios.

Daiber et al. (2005) investigaram os efeitos da HDZ na quimiluminescência induzida por superóxido/peroxinitrito, bem como na produção de ERO mitocondrial na exposição à nitroglicerina. Nesse estudo, a HDZ exibiu uma forte capacidade de sequestrador de ERO e inibiu a geração de O_2 . Quando administrado com nitroglicerina, a HDZ preveniu o desenvolvimento da tolerância ao nitrato e normalizou as taxas endógenas de produção de O_2 vascular.

Essa atividade antioxidante da HDZ pode estar relacionada à presença de

ligações NH conjugadas, fazendo com que possua excelentes propriedades de eliminação de radicais (BOULEBD et al., 2020). Em estudo realizado por LI et al., (2020), os autores utilizaram a HDZ e perceberam que a mesma causou uma proteção no miocárdio contra a lesão de isquemia e reperfusão, ao inibir a superprodução de espécies reativas de oxigênio e a liberação de fatores inflamatórios. A antioxição e a supressão da reação inflamatória são mecanismos pelos quais a hidralazina protege o coração (LI et al., 2020).

A fim de lançar alguma luz sobre os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos da HDZ na sepse, a participação da via de sinalização PI3K/Akt nos efeitos da HDZ foi investigada. Estudos em modelos com sepse mostraram que a via PI3K/Akt é fundamental na regulação da ativação celular, inflamação e apoptose (AN et al., 2016; KIM et al., 2014, LI et al., 2012). No presente estudo, a sepse produziu maior ativação desta via no fígado e no rim, o que foi prevenido pela administração da HDZ. Esses achados são consistentes com a literatura, uma vez que estudos anteriores mostraram que a ativação da via PI3K/Akt aumenta em órgãos como o fígado (Wang et al., 2019) e rins (LI et al., 2016), mas pode diminuir no baço (HU et al., 2015) após o procedimento CLP ou utilização do LPS (LI et al., 2016). Essa diminuição encontrada no baço pode estar relacionada ao fato de ser um órgão linfóide secundário, que desempenha um papel importante na fisiopatologia da sepse e é considerado a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias durante a fase aguda da sepse (HOOVER et al., 2020).

Em um trabalho sobre a cardioproteção da hidralazina contra lesão de isquemia/reperfusão miocárdica em ratos, os autores destacaram que a HDZ aumentou a expressão de p-PI3K, p-Akt, p-eNOS e diminuiu a expressão de Caspase-3 Clivada, Caspase-9 Clivada nos corações. Os autores sugerem que esse efeito cardioprotetor da HDZ contra a lesão de isquemia/reperfusão pode ser uma cooperação da inibição do estresse oxidativo, resposta inflamatória e apoptose com a motivação da fosforilação da eNOS via ativação da via de sinal PI3K/Akt. O aumento da ativação de eNOS, PI3K e Akt dotou a hidralazina de capacidade antiapoptótica e cardioprotetora (LI et al., 2020).

Além de estar envolvida nos processos de inflamação e apoptose, a via PI3K/Akt também participa do controle da glicose. A ativação dessa cascata está

envolvida com o fenômeno da hipoglicemia, uma vez que interfere na captação de glicose (da SILVA et al., 2018). Conforme relatado anteriormente no presente estudo, a glicemia é um indicador da gravidade da sepse (LEWIS et al., 2016; SOUSA et al., 2019; TSAI et al., 2011) e, portanto, é possível hipotetizar que a ativação da via PI3K/Akt também pode estar associada à hipoglicemia e alta mortalidade no grupo sepse. Nesse sentido, os grupos com as menores concentrações de glicemia são os que apresentam maior mortalidade (FERREIRA et al, 2017).

A HDZ parece ter um benefício multifatorial e em diferentes pontos da cascata fisiopatológica da sepse. Já que tem efeito antioxidante, diminuindo os danos às células e/ou organelas, que é a via final da disfunção orgânica. Bem como um efeito anti-inflamatório, reduzindo as citocinas (Figura 21).

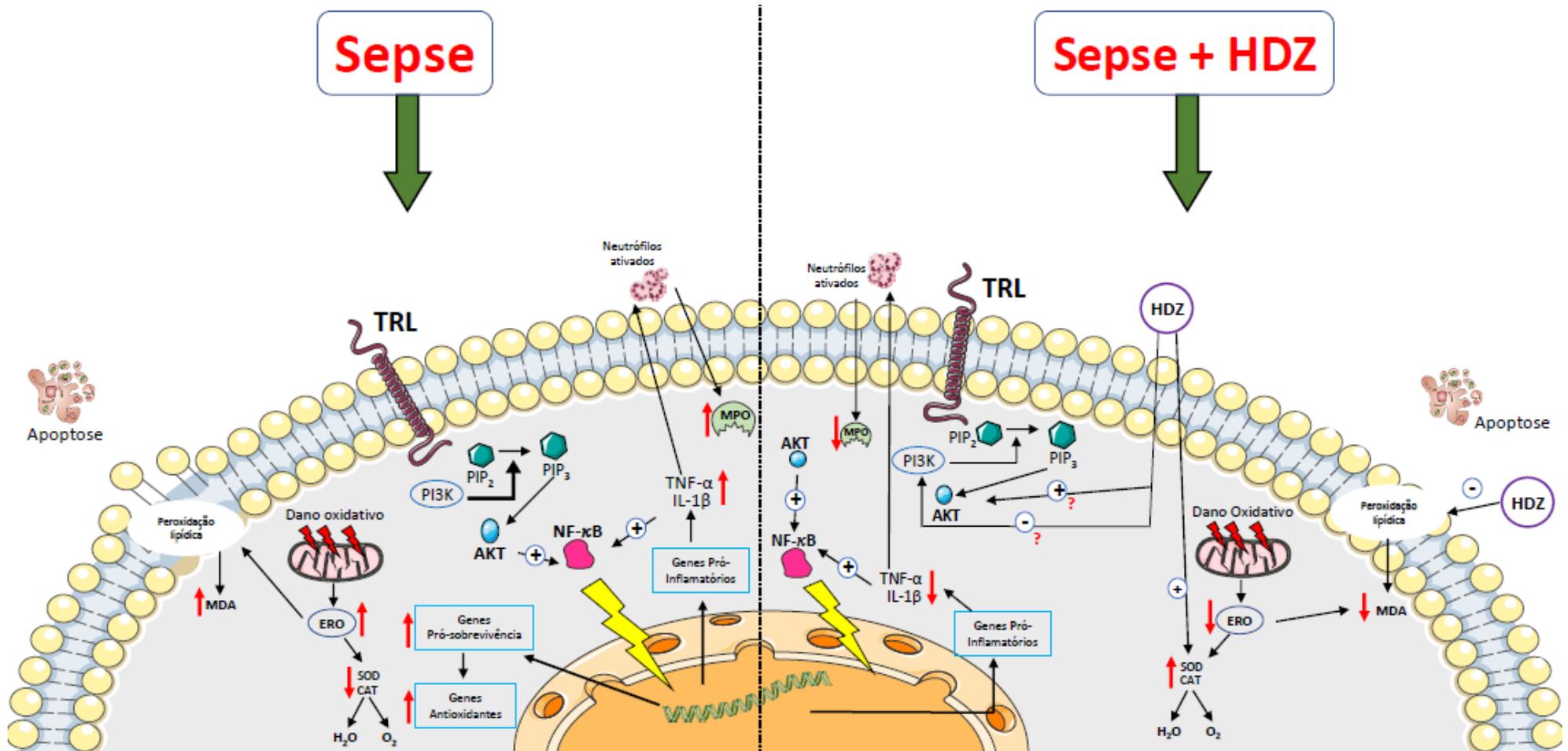


Figura 24: Possíveis mecanismos de ação da hidralazina e seus efeitos protetores na sepsis. AKT, proteína cinase B; CAT, enzima catalase; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; IL, interleucina; MDA, malondialdeído; MPO, Mieloperoxidase; NF-κB, fator nuclear kappa B; O₂, oxigênio; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PIP₂, fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato; PIP₃, fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato; ERO, espécies reativas de oxigênio; SOD, enzima superóxido dismutase; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; TRL, receptor toll-like. Fonte: Elaborada pelo autor.

A administração da HDZ foi realizada com muito tempo após a indução da sepse (04 h após o CLP) e, mesmo assim, obteve boa eficácia. Demonstrando que esse medicamento tem potencial efeito no tratamento da sepse, pois, após decorrido esse tempo, os animais já apresentavam fortes sinais de debilitação. Isso acaba sendo um forte ponto positivo, pois é semelhante ao que acontece na prática clínica, onde os médicos raramente iniciam o tratamento da sepse precocemente devido ao diagnóstico muitas vezes tardio.

Em resumo, o presente estudo relata pela primeira vez evidências farmacológicas dos efeitos do HDZ na sepse. HDZ tem importantes efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, metabólicos e bioquímicos, resultando em uma melhora significativa nos parâmetros clínicos e na taxa de sobrevivência. Ressalta-se que esses efeitos benéficos ocorreram após o desencadeamento das alterações fisiopatológicas da sepse. Não é comum encontrar na sepse experimental manobras que mudem de curso após o estímulo inicial ter sido acionado.

Além disso, o presente estudo representa um avanço tanto na elucidação da patogênese quanto na descoberta de novas estratégias terapêuticas, que podem ser úteis para diminuir a mortalidade de pacientes com sepse. Com esses resultados, um outro artigo fora escrito e submetido para publicação na revista Shock (Anexo C).

Apesar disso, o presente estudo apresenta algumas limitações, a saber: (i) a administração da HDZ não foi realizada juntamente com algum antibiótico, como é encontrado na prática clínica; (ii) a cirurgia de CLP foi realizado em animais jovens saudáveis. São necessários estudos com animais senis e/ou que também tenham alguma comorbidade; e (iii) outros biomarcadores importantes de resposta inflamatória, como proteína C reativa (PCR) e IL-6, não foram avaliados.

7 CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados encontrados na revisão sistemática, podemos concluir que entre os pacientes sépticos, o diagnóstico de hipoperfusão e anormalidades microcirculatórias em órgãos não vitais foi associado ao aumento da mortalidade em quase todos os estudos selecionados para a revisão. A associação foi encontrada independente de os pacientes terem sido avaliados precoce ou tardiamente em relação ao tempo de tratamento hemodinâmico da sepse.

Tomados em conjunto, os resultados oriundos do estudo experimental, nos permite concluir que a administração com a HDZ foi bastante benéfica no tratamento dos animais sépticos. Apesar de ter diminuído os parâmetros hemodinâmicos como a PAM, FC, PAS e PAD, esse tratamento proporcionou um aumento na taxa de sobrevivência, diminuição da severidade da sepse, evitou a hipotermia, a perda de massa corpórea, a queda na concentração da glicose e diminuiu a concentração do lactato.

Com relação a resposta inflamatória, podemos concluir que o tratamento com a HDZ aumentou essa resposta através da redução das concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-10), assim como da atividade da MPO. O tratamento com a HDZ também apresentou um aumento na resposta oxidativa, uma vez que diminuiu os danos causados às proteínas e aos lipídios, assim como aumentou a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase nos tecidos do baço, fígado e rim. Esses efeitos envolvem a ativação das vias de sinalização PI3K/Akt

Assim, o presente estudo fornece evidências importantes de que a HDZ pode ser uma nova alternativa terapêutica para reduzir a mortalidade na sepse. No entanto, são necessários mais estudos, principalmente clínicos para confirmar esses efeitos na sepse humana.

7.1 Perspectivas Futuras

As perspectivas futuras incluem a realização de estudos que associem o uso da hidralazina com antibióticos, uma vez que essa é uma prática encontrada na clínica; a dosagem de alguns biomarcadores importantes na resposta inflamatória, como a proteína C reativa e a Interleucina-6; marcadores bioquímicos de danos hepáticos, renais e cardíacos; estudo com cultivo de células isoladas; estudos com reatividade vascular, para investigar a participação do NO na microvasculatura em anéis de artéria mesentérica, assim como em leito mesentérico perfundidos; avaliar a participação da NOS e do NO, através de Western Blot;

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Critical care medicine**, v. 35, n. 10, p. 2408-2416, 2007.
- AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic Press. p. 121-126, 1984.
- AIT-OUFELLA, H.; BIGE, N.; BOELLE, P. Y. et al. Capillary refill time exploration during septic shock. *Intensive Care Med.* 40:958-64, 2014.
- AIT-OUFELLA, H. JOFFRE, J.; BOELLE, P. Y. et al. Knee area tissue oxygen saturation is predictive of 14-day mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 38:976-83, 2012.
- AIT-OUFELLA, H.; LEMOINNE, S.; BOELLE, P. Y. et al. Mottling score predicts survival in septic shock. *Intensive Care Med.* 37:801-7, 2011.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.
- AL KHALAF, M. S.; AL EHNIDI, F. H.; AL-DORZI, H. M. et al. Determinants of functional status among survivors of severe sepsis and septic shock: one-year follow-up. **Annals of Thoracic Medicine**, v. 10, n. 2, p. 132, 2015.
- ALMEIDA, B. F. M. Estresse oxidativo na leishmaniose visceral canina. *Fisiologia Médica e Cirúrgica*. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba, São Paulo, 2013.
- AN, R.; ZHAO L.; XI, C. et al. Melatonin attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a PI3K/Akt-dependent mechanism. **Basic research in cardiology**, v. 111, n. 1, p. 8, 2016.
- ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe Sepsis and Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, p. 840-851, 2013.
- ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. In: **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 109-16, 2001.
- ARCAROLI, J.; SILVA, E.; MALONEY, J. P. et al. Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-kappaB activation and worse outcomes in sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 173, n. 12, p. 1335-1341, 2006.
- ASSREUY, J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 6, n. 2, p. 165-173, 2006.
- BAI, J.; ZHANG, W.; ZHANG, J. et al. Myocardial oxidative stress injury and myocardial ultrastructure in septic rats. **Chinese**, v. 31, n. 5, p. 634-8, 2015.
- BAI, X.; YU, W.; JI, W. et al. Early versus delayed administration of norepinephrine in

patients with septic shock. **Critical care**, v. 18, n. 5, p. 532, 2014.

BANG, L.; NIELSEN-KUDSK, J. E.; GRUHN, N. et al Trautner, S., Theilgaard, S. A., Olesen, S. P., ... & Aldershvile, J. Hydralazine-induced vasodilation involves opening of high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. **European journal of pharmacology**, 361(1), 43-49, 1998.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 23, 629-643, 2010.

BEDIRLI, N.; BAGRIACIK, E. U.; YILMAZ, G. et al. Sevoflurane exerts brain-protective effects against sepsis-associated encephalopathy and memory impairment through caspase 3/9 and Bax/Bcl signaling pathway in a rat model of sepsis. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 7, p. 2828-2842, 2018.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.

BOSE, R.; SUTHERLAND, G. R.; PINSKY, C. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. **Neurochemical research**, 14(3), 217-220, 1989.

BOULEBD, H.; KHODJA, I. A.; BAY M. V. et al. Thermodynamic and kinetic studies of the radical scavenging behavior of hydralazine and dihydralazine: theoretical insights. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 20, p. 4123-4131, 2020.

BOURCIER, S.; PICHEREAU, C.; BOELLE, P. Y. et al. Toe-to-room temperature gradient correlates with tissue perfusion and predicts outcome in selected critically ill patients with severe infections. *Ann Intensive Care*, 6:63-71, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Brasília, 2013. Disponível em: <www.datasus.gov.br> Acesso em: 22 out. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Brasília, 2020. Disponível em: <www.datasus.gov.br> Acesso em: 19 jan. 2021.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 10, p. 854-865, 2005.

BURCHAM, P. C. Carbonyl scavengers as pharmacotherapies in degenerative disease: Hydralazine repurposing and challenges in clinical translation. **Biochemical pharmacology**, v. 154, p. 397-406, 2018.

CASTROGIOVANNI, P.; IMBESI, R. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise. **Italian Journal of Anatomy and Embryology -Archivioltaliano Di Anatomia Ed Embriologia**, v. 117, n. 2, p. 107-117, 2012.

CHERTOFF, J.; CHISUM, M.; GARCIA, B.; LASCANO, J. Lactate kinetics in sepsis and septic shock: a review of the literature and rationale for further research. **Journal of intensive care**, v. 3, n. 1, p. 39, 2015.

CHIRKOV, Y. Y.; SCISCIO, M.; SVERDLOV, A. L. et al. Hydralazine does not ameliorate nitric oxide resistance in chronic heart failure. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 24, n. 2, p. 131-137, 2010.

CHUNG, K. W.; KIM, K. M.; CHOI, Y. J. et al. The critical role played by endotoxin-induced liver autophagy in the maintenance of lipid metabolism during sepsis. **Autophagy**. v. 13, n. 7, p. 1113-29, 2017.

COSTA, M. B. V.; AZEVEDO PONTE, K. M.; FROTA, K. C. et al. Epidemiological characteristics of patients with sepsis in intensive therapy unit. **Journal of Epidemiology and Infection Control**, 9(4), 2019.

COSTA, N. A.; GUT, A. L.; AZEVEDO, P. S. et al. Erythrocyte superoxide dismutase as a biomarker of septic acute kidney injury. **Annals of intensive care**, v. 6, n. 1, p. 95, 2016.

DA SILVA, K. L. C.; CAMACHO, A. P.; MITTESTAINER, F. C.; et al. Atorvastatin and diacerein reduce insulin resistance and increase disease tolerance in rats with sepsis. **Journal of Inflammation**, v. 15, n. 1, p. 8, 2018. SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Critical Care*, v. 8, n. 4, p. R251–60, 2004.

DAIBER, A.; OELZE, M.; COLDEWEY, M. et al. Hydralazine Is a Powerful Inhibitor of Peroxynitrite Formation as a Possible Explanation for Its Beneficial Effects on Prognosis in Patients with Congestive Heart Failure. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 338, 1865-1874, 2005.

DE BACKER, D.; CORTES, D. B.; DONADELLO, K. et al. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. **Virulence**. 5:73-9, 2014.

DE BACKER, D.; CRETEUR, J.; PREISER, J. C. et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**. 166:98-104, 2002.

DE BACKER, D.; DONADELLO, K.; SAKR, Y, et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. **Crit Care Med.**, 41:791-9, 2013.

DE SOUZA, J. A.; AMARAL, A. A. L. C.; TAVARES, G. A. et al. Dual exposure to stress in different stages of development affects eating behavior of male Wistar rats. **Physiology & Behavior**. v. 214, p. 112769, 2020.

DEHGHAN, E.; GOODARZI, M.; SAREMI, B. et al. Hydralazine targets cAMP-dependent protein kinase leading to sirtuin1/5 activation and lifespan extension in *C. elegans*. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2019.

DEJAGER, Lien; PINHEIRO, Iris; DEJONCKHEERE, Eline; LIBERT, Claude. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198-208, 2011.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; DJILLALI, A. al. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign:

international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Crit Care Med**, v. 41, n. 2, p. 580-637, 2013.

DILLMAN, N. O.; ANDERS, M. M.; MOFFETT, B. S. Use of Continuous Infusion Hydralazine in a Pediatric Patient on Mechanical Circulatory Support. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, v. 21, n. 3, p. 252-255, 2016.

DOERSCHUG, K. C.; DELSING, A. S.; SCHMIDT, G. A. et al. Impairments in microvascular reactivity are related to organ failure in human sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 293: H1065-71, 2007.

DOWNIE, L.; ARMIENTO, R.; SUBHI, R. et al. Community-acquired neonatal and infant sepsis in developing countries: efficacy of WHO's currently recommended antibiotics: systematic review and meta-analysis. In: **Archives of Disease in Childhood**, v. 98, n. 2, p. 146-54, 2013.

DREWRY, A. M.; FULLER, B. M.; SKRUPKY, L. P. et al. The presence of hypothermia within 24 hours of sepsis diagnosis predicts persistent lymphopenia. **Critical care medicine**, v. 43, n. 6, p. 1165, 2015.

DUMONT, O.; PINAUD, F.; GUIHOT, A. L. et al. Alteration in flow (shear stress)-induced remodelling in rat resistance arteries with aging: improvement by a treatment with hydralazine. **Cardiovascular research**, v. 77, n. 3, p. 600-608, 2008.

EDUL, V. S. K.; ENRICO, C.; LAVIOLLE, B. et al. Quantitative assessment of the microcirculation in healthy volunteers and in patients with septic shock. **Crit Care Med.**, 40:1443-8, 2012.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**. 1959; v. 82, n. 1, p. 70-77.

ERIKSON, K.; LIISANANTTI, J. H.; HAUTALA, N. et al. Retinal arterial blood flow and retinal changes in patients with sepsis: preliminary study using fluorescein angiography. **Crit Care**. 2017;21: 86---93.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 407-421, 1990.

FARINHA, A. **Estudo da utilização de marcadores bioquímicos no diagnóstico de Sepsis**. Dissertação, Funchal, Portugal, 2019.

FENG, X.; GUAN, W.; ZHAO, Y. et al. Dexmedetomidine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in rats by inhibiting inflammation and oxidative stress via the GSK-3 β /Nrf2 signaling pathway. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 10, p. 18994-19009, 2019.

FERREIRA, F. B. D.; SANTOS, C.; BRUXEL, M. A. et al. Glucose homeostasis in two degrees of sepsis lethality induced by caecum ligation and puncture in mice. **International journal of experimental pathology**, v. 98, n. 6, p. 329-340, 2017.

FLYNN, J. T.; BRADFORD, M. C.; HARVEY, E. M. Intravenous Hydralazine in Hospitalized Children and Adolescents with Hypertension. **The journal of pediatrics**, v. 168, p. 88-92, 2016.

FONTANA, V.; SPADARO, S.; BOND, O. et al. No relationship between red blood cell distribution width and microcirculatory alterations in septic patients. **Clin Hemorheol Microcirc**, 66:131-41, 2017.

GALBOIS, A.; BIGÉ, N.; PICHEREAU, C. et al. Exploration of skin perfusion in cirrhotic patients with septic shock. **J Hepatol**, 62:549-55, 2015.

GARCIA, L. S. B.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S. et al. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 450-455, 2009.

GLODOWSKI, S. D.; WAGENER, G. New insights into the mechanisms of acute kidney injury in the intensive care unit. **J Clin Anesth**, v. 27, n. 4, p 175-180, 2015.

GOTMAKER, R.; PEAKE, S.; FORBES, A. et al. Mortality is greater in septic patients with hyperlactatemia than with refractory hypotension. **Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches**, v. 48, n. 3, p. 294-300, 2017.

GUO, X.; HAN, C.; MA, K. et al. Hydralazine protects nigrostriatal dopaminergic neurons from MPP(+) and MPTP induced neurotoxicity: roles of Nrf2-ARE signaling pathway. **Frontiers in Neurology**, v. 10, p. 271, 2019.

HE, H. W.; LIU, D. W.; LONG, Y. et al. The peripheral perfusion index and transcutaneous oxygen challenge test are predictive of mortality in septic patients after resuscitation. **Crit Care**, 17:116-25, 2013.

HERMAN, L. L.; TIVAKARAN, V. S. Hydralazine. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.

HERNANDEZ, G.; BOERMA, E. C.; DUBIN, A. et al. Severe abnormalities in microvascular perfused vessel density are associated to organ dysfunctions and mortality and can be predicted by hyperlactatemia and norepinephrine requirements in septic shock patients. **J Crit Care**, 28:538-43, 2013.

HERNANDEZ, G.; TEBOUL, J. L. Is the macrocirculation really dissociated from the microcirculation in septic shock? **Intensive Care Med**, 42:1621-4, 2016.

HILLEGASS, L. M.; GRISWOLD, D. E.; BRICKSON, B.; et al. Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. **Journal of pharmacological methods**, v. 24, n. 4, p. 285-295, 1990.

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 6, n. 6, p. 1-14, 2004.

HOFFMAN, M.; KYRIAZIS, I. D.; DIMITRIOU, A. et al. B-type natriuretic peptide is upregulated by c-Jun N-terminal kinase and contributes to septic hypotension. **JCI insight**, v. 5, n. 8, 2020.

HOOVER, D. B.; POSTON, M. D.; BROWN, S. et al. Cholinergic leukocytes in sepsis and at the neuroimmune junction in the spleen. **International Immunopharmacology**, v. 81, p. 106359, 2020.

HOTCHKISS, R. S., MOLDAWER, L. L., OPAL, S. M. et al. Sepsis and septic shock. **Nature reviews Disease primers**, 2(1), 1-21, 2016.

HOUWINK, A. P.; RIJKENBERG, S.; BOSMAN, R. J. et al. The association between lactate, mean arterial pressure, central venous oxygen saturation and peripheral temperature and mortality in severe sepsis: a retrospective cohort analysis. **Crit Care**. 2016;20: 56, 2016.

HU, D.; YANG, X.; XIANG, Y. et al. Inhibition of Toll-like receptor 9 attenuates sepsis-induced mortality through suppressing excessive inflammatory response. **Cellular immunology**, v. 295, n. 2, p. 92-98, 2015.

HUBBARD, W. J.; CHOUDHRY, M.; SCHWACHA, M. G. et al. Cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 24, p. 52-57, 2005.

INCE, C. Hemodynamic coherence and the rationale for monitoring the microcirculation. **Crit Care**, 19:8-20, 2015.

INGRAM, N. Procalcitonin: does it have a role in the diagnosis, management and prognosis of patients with sepsis?. **Journal of the Intensive Care Society**, v. 14, n. 3, p. 226-230, 2013.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE - ILAS. **Campanha Sobrevivendo a Sepsis**. Relatório Nacional. São Paulo, 2014.

Instituto Latino Americano de Sepsis. **Implementação de Protocolo Gerenciado de Sepsis Protocolo Clínico**: Atendimento ao paciente adulto com sepsis/choque séptico. São Paulo, 2015.

JOHNSON, P.; WEI, Y.; HUENTELMAN, M. J. et al. Hydralazine, but Not Captopril, Decreases Free Radical Production and Apoptosis in Neurons and Thymocytes. **Free Radic. Res**, 28, 393-402, 1998.

KAKIHANA, Y.; ITO, T.; NAKAHARA, M.; YAMAGUCHI, K.; YASUDA, T. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. **Journal of Intensive Care**, v. 4, n. 1, p. 22, 2016.

KANG, H.; MAO, Z.; ZHAO, Y. et al. Ethyl pyruvate protects against sepsis by regulating energy metabolism. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 12, p. 287, 2016.

KARDEŞ, S.; KARAGÜLLE, M.; DURAK, Í. et al. Association of oxidative stress with clinical characteristics in patients with rheumatoid arthritis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 1, p. e12858, 2018.

KELLUM, J. A.; PROWLE, J. R. Paradigms of acute kidney injury in the intensive care setting. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 4, p. 217, 2018.

- KIM, T. H.; KIM, S. J.; LEE, S. M. Stimulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor protects against sepsis by inhibiting toll-like receptor via phosphoinositide 3-kinase activation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 10, p. 1668-1677, 2014.
- KIM, Y. A.; HA, E. J.; JHANG, W. K. et al. Early blood lactate area as a prognostic marker in pediatric septic shock. **Intensive Care Medicine**, v. 39, n. 10, p. 1818-1823, 2013.
- KODYDKOVÁ, J.; VÁVROVÁ, L.; KOCÍK, M.; ZÁK, A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. **Folia Biologica**, v. 60, n. 4, p. 153, 2014.
- KOKKINAKI, D.; HOFFMAN, M.; KALLIORA, C. et al. Chemically synthesized Secoisolariciresinol diglucoside (LGM2605) improves mitochondrial function in cardiac myocytes and alleviates septic cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 127, p. 232-245, 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254, 1976.
- KUBOTA, K.; SAIWAI, H.; KUMAMARU, H. et al. Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. v. 37, n.16, p. 1363–9, 2012.
- KULKARNI, U.; HERRMENAU, C.; WIN, S. J. et al. IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells. **PloS One**. 2018; v. 13, n. 2, p. e0192304, 2018.
- KUMAR, S.; GUPTA, E.; KAUSHIK, S. et al. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status: Correlation with the severity of sepsis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 87, n. 4, p. e12653, 2018.
- LAITANO, O.; VAN STEENBERGEN, D.; MATTINGLY, A. J. et al. Xiphoid Surface Temperature Predicts Mortality in a Murine Model of Septic Shock. **Shock**. v. 50, n. 2, p. 226-232, 2018.
- LARA, B.; ENBERG, L.; ORTEGA, M.; et al. Capillary refill time during fluid resuscitation in patients with sepsis-related hyperlactatemia at the emergency department is related to mortality. **PloS One**, 12:e0188548, 2017.
- LELUBRE, C.; VINCENT, J. L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 417, 2018.
- LEONE, M.; BLIDI, S.; ANTONINI, F. et al. Oxygen tissue saturation is lower in nonsurvivors than in survivors after early resuscitation of septic shock. **Anesthesiol**, 111:366-71, 2009.
- LEVER, A.; MACKENZIE, I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. **Bmj**, v. 335, n. 7625, p. 879-883, 2007.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: *Methods in enzymology*. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LEWIS, A. J.; BILLIAR, T. R.; ROSENGART, M. R. Biology and metabolism of sepsis: innate immunity, bioenergetics, and autophagy. **Surgical infections**, v. 17, n. 3, p. 286-293, 2016.

LI, C.; HUA, F.; HA, T. et al. Activation of myocardial phosphoinositide-3-kinase p110 α ameliorates cardiac dysfunction and improves survival in polymicrobial sepsis. **PLoS One**. v. 7, n. 9, p. e44712, 2012.

LI, C.; SU, Z.; GE, L.; et al. Cardioprotection of hydralazine against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. **European journal of pharmacology**, 869, 172850, 2020.

LI, G.; JIA, J.; JI, K. et al. The neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, attenuates sepsis-related kidney injury in rats. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 3, p. 767-775, 2016.

LI, Y.; HOU, D.; CHEN, X. et al. Hydralazine protects against renal ischemia-reperfusion injury in rats. **European journal of pharmacology**, 843, 199-209, 2019.

LIAUDET, L.; ROSENBLATT-VELIN, N.; PACHER, P. Role of peroxynitrite in the cardiovascular dysfunction of septic shock. **Current Vascular Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 196-207, 2013.

LIMA A, BAKKER J. Clinical monitoring of peripheral perfusion: there is more to learn. **Crit Care**, 18:113-5, 2014.

LIN, Z.; JIN, J.; SHAN, X. Fish oils protects against cecal ligation and puncture-induced septic acute kidney injury via the regulation of inflammation, oxidative stress and apoptosis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 44, n. 5, p. 1771-1780, 2019.

LOPES, R. D.; SILVA, A. M. B.; BONILLHA, A. M. M. **Sepse grave e choque séptico**: aspectos clínicos. Guimarães, HP, Lopes, RD & Lopes, AC Tratado de medicina de urgência, emergência, pronto-socorro e UTI. São Paulo, Atheneu, v. 2, p. 1227-1238, 2010.

LORA-ANDOSILLA, M.; CANTILLO-GARCÍA, K.; BORRÉ-NARANJO, D. et al. Biomarkers in sepsis. In **Sepsis** (pp. 39-50). Springer, New York, NY, 2018.

LOUFRANI, L.; HENRION, D. Vasodilator treatment with hydralazine increases blood flow in mdx mice resistance arteries without vascular wall remodeling or endothelium function improvement. **Journal of Hypertension**, v. 23, n. 10, p. 1855-1860, 2005.

LUBRANO, V.; Balzan, S. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. **World J Exp Med**. v. 5, n. 4, p. 218–24, 2015.

MACDONALD, S. P.; KINNEAR, F. B.; ARENDTS, G.; et al. Near-infrared spectroscopy to predict organ failure and outcome in sepsis: the Assessing Risk in

Sepsis using a Tissue Oxygen Saturation (ARISTOS) study. **Eur J Emerg Med**, 26: 174-9, 2019.

MACHADO, A. P.; ZURITA, R. M.; LIMA, C. B. et al. Clássicos e novos biomarcadores de sepse neonatal. **Saúde (Santa Maria)**, v. 43, n. 3, 2017.

MAHESHWARI, K.; NATHANSON, B. H.; MUNSON, S. H. et al. The relationship between ICU hypotension and in-hospital mortality and morbidity in septic patients. **Intensive Care Medicine**, v. 44, n. 6, p. 857-867, 2018.

MAHESHWARI, M.; ROBERTS, J. K.; DESUTTER, B. et al. Hydralazine modifies A β fibril formation and prevents modification by lipids in vitro. **Biochemistry**, v. 49, n. 49, p. 10371-10380, 2010.

MARI, A.; VALLÉE, F.; BEDEL, J. et al. Oxygen challenge test in septic shock patients: prognostic value and influence of respiratory status. **Shock**, 2014;41:504-9, 2014.

MARKLUND, S. L. Pyrogallol autooxidation. Handbook of methods for oxygen radical research. **Greenwald RA**, v. 243, p. 247, 1985.

MATEEN, S.; MOIN, S.; KHAN, A. et al. Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **PloS One**, v. 11, n. 4, p. e0152925, 2016.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4-11, 2014.

MCCOMB, M. N.; Chao, J. Y.; Ng, T. M. Direct vasodilators and sympatholytic agents. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, v. 21, n. 1, p. 3-19, 2016.

MCDONALD, A. P.; MEIER, T. R.; HAWLEY, A. E. et al. Aging is associated with impaired thrombus resolution in a mouse model of stasis induced thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 125, n. 1, p. 72-8, 2010.

MEHRABANI, M.; NEMATOLLAHI, M. H.; TARZI, M. E. et al. Protective effect of hydralazine on a cellular model of Parkinson's disease: a possible role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . **Biochemistry and Cell Biology**, v. 98, n. 3, p. 405-414, 2020.

MICHELS, M.; DANIESLKI, L. G.; VIEIRA, A. et al. CD40-CD40 ligand pathway is a major component of acute neuroinflammation and contributes to long-term cognitive dysfunction after sepsis. **Molecular Medicine**, v. 21, n. 1, p. 219-226, 2015.

MIFSUD, E. J.; TAN, A. C.; JACKSON, D. C. TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 79, 2014.

MILEO, A. M.; MICCADEI, S. Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: new therapeutic strategies. **Oxid Med Cell Longev**. p. 1-17, 2016.

MISHRA, H. K.; MA, J.; WALCHECK, B. Ectodomain shedding by ADAM17: its role in neutrophil recruitment and the impairment of this process during sepsis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 138, 2017.

MOURA, V. B. L. **Lesão tecidual e perfil de citocinas na neurocisticercose experimental**, Tese de doutorado, Goiás, GO, 2015.

MUCHA, C. J. **Arterial Hypertension**, In: Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress Wsava, 2009, Sao Paulo, Anais. São Paulo, 2009.

NDUKA, O. O.; PARRILLO, J. E. The pathophysiology of septic shock. **Critical Care Nursing Clinics**, v. 23, n. 1, p. 41-66, 2011.

NING, Q.; LIU, Z.; WANG, X. et al. Neurodegenerative changes and neuroapoptosis induced by systemic lipopolysaccharide administration are reversed by dexmedetomidine treatment in mice. **Neurological Research**, v. 39, n. 4, p. 357-366, 2017.

NISHIKAWA, M.; HASHIDA, M.; TAKAKURA, Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. **Adv. Drug Deliv.** v. 61, p. 319-26, 2009.

NOBRE, V.; BORGES, I. Núcleo Interdisciplinar de Investigação em Medicina Intensiva (NIIMI). Prognostic value of procalcitonin in hospitalized patients with lower respiratory tract infections. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 28, n. 2, p. 179-89, 2016.

OKUSAWA, S.; GELFAND, J. A.; IKEJIMA, T. et al. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 81, n. 4, p. 1162-1172, 1988.

OLIVEIRA, Y. P.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; COUTO, R. D.; NORONHA-DUTRA, A. A. Oxidative stress in sepsis. Possible production of free radicals through an erythrocyte-mediated positive feedback mechanism. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 19-26, 2017.

OPAL, S. M.; DELLINGER, P. R.; VINCENTE, J. L. et al. The next generation of sepsis clinical trial designs. **What is next after the demise of recombinant human activated protein C?**, v. p.42, 2014.

OSTRYE, J. H.; JONES, J.; EGAN, B. et al. The efficacy and safety of intravenous hydralazine for the treatment of hypertension in the hospitalized child. **Pediatric nephrology**, v. 29, n. 8, p. 1403-1409, 2014.

PETRONILHO, F.; FLORENTINO, D.; DANIELSKI, L. G. et al. Alpha-lipoic acid attenuates oxidative damage in organs after sepsis. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 357-365, 2016.

PETRONILHO, F.; GIUSTINA, A. D.; NASCIMENTO, D. Z. et al. Obesity exacerbates sepsis-induced oxidative damage in organs. **Inflammation**, v. 39, n. 6, p. 2062-2071, 2015.

- PIRES, B. C.; DE CARVALHO, N. M. S.; LOPES, J. R. et al. Acute kidney injury during severe sepsis in a hospital setting. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 13557-13564, 2020.
- PUGIN, J. Adrenomedullin: a vasodilator to treat sepsis?. **Critical Care**, v. 18, n. 3, p. 152, 2014.
- Rasmy, I.; Mohamed, H.; Nabil, N. et al. Evaluation of perfusion index as a predictor of vasopressor requirement in patients with severe sepsis. **Shock**, 44:554-9, 2015.
- REINHART, K.; DANIELS, R.; MACHADO, F. R. The burden of sepsis: a call to action in support of World Sepsis Day 2013. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 25, n. 1, p. 3-5, 2013.
- REIS, P. A.; ALEXANDRE, P. C. B.; D'AVILA, J. C. et al. Statins prevent cognitive impairment after sepsis by reverting neuroinflammation, and microcirculatory/endothelial dysfunction. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 60, p. 293-303, 2017.
- RICCI, Z.; Polito, A.; Polito, A.; Ronco, C. The implications and management of septic acute kidney injury. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 4, p. 218, 2011.
- RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, M. S.; FLIERL, Micheal, A. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2009.
- RODRIGUES, S. F.; OLIVEIRA, M. A.; SANTOS, R. A. et al. Hydralazine reduces leukocyte migration through different mechanisms in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 589, n. 1-3, p. 206-214, 2008.
- RODRÍGUEZ, A.; CLAVERIAS, L.; MARÍN, J. et al. Regional oxygen saturation index (rSO₂) in brachioradialis and deltoid muscle. Correlation and prognosis in patients with respiratory sepsis. **Med Intensiva**, 39:68-75, 2015.
- RODRIGUEZ, A. LISBOA, T.; MARTÍN-LOECHES, I. et al. Mortality and regional oxygen saturation index in septic shock patients: a pilot study. **J Trauma Acute Care Surg**, 70:1145-52, 2011.
- RUSSELL, J. A. Management of sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 16, p. 1699-1713, 2006.
- SAGY, M.; AL-QAQAA, Y.; KIM, P. Definitions and pathophysiology of sepsis. **Current problems in pediatric and adolescent health care**, v. 43, n. 10, p. 260-263, 2013.
- SAKR, Y.; DUBOIS, M. J.; DE BACKER, D. et al. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. **Crit Care Med**, 32: 1825-31, 2004.
- SAKR, Y.; GATH, V.; OISHI, J. et al. Characterization of buccal microvascular response in patients with septic shock. **Eur J Anaesthesiol**, 27:388-94, 2010.

SALOMÃO, R.; PETRONILHO, F.; RITTER, C. Fisiopatologia da Sepse. In.: Azevedo, L.C.P. & Machado, F.R. (Ed.). **Sepse**. São Paulo, Atheneu, 13-20, 2014.

SANTOS, D. M. D., QUINTANS, J. S., QUINTANS-JUNIOR, L. J. et al. Association between peripheral perfusion, microcirculation and mortality in sepsis: a systematic review. **Revista brasileira de anesthesiologia**, 69(6), 605-621, 2019.

SCHMIDT, R.; BAECHLE, T.; HOETZEL, A. et al. Dihydralazine treatment limits liver injury after hemorrhagic shock in rats. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 3, p. 815-822, 2006.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

SHAPIRO, N. I. ARNOLD, R.; SHERWIN, R. et al. The association of near-infrared spectroscopy-derived tissue oxygenation measurements with sepsis syndromes, organ dysfunction and mortality in emergency department patients with sepsis. **Crit Care**, 15:223-32, 2011.

SHRUM, B.; ANANTHA, R. V.; XU, S. X. et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2014.

SILVA, C. T. D.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

SINGER, M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 66-72, 2014.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; ALBUQUERQUE, V. S. et al. Ensino de imunologia na educação médica: lições de Akira Kurosawa. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 33, n. 2, p. 186-190, 2009.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CALIXTO-LIMA, L. et al. Sepse: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 2011.

SNELL, T. W.; JOHNSTON, R. K.; ZHOU, B. et al. Repurposing FDA-approved drugs for anti-aging therapies. **Biogerontology**, v. 17, n. 5-6, p. 907-920, 2016.

SONG, G. Y.; CHUNG C. S.; CHAUDRY, I. H.; AYALA, A. What is the role of interleukin 10 in polymicrobial sepsis: anti-inflammatory agent or immunosuppressant? **Surgery**, v. 126, n. 2, p. 378-383, 1999.

SOUSA, M. S. B.; ALVES, D. V. S.; MONTEIRO, H. M. C. et al. Sepsis impairs the propagation of cortical spreading depression in rats and this effect is prevented by antioxidant extract. **Nutritional Neuroscience**, p. 1-10, 2019.

SPANOS, A.; JHANJI, S; VIVIAN-SMITH, A. et al. Early microvascular changes in sepsis and severe sepsis. **Shock**, 33:387-91, 2010.

STECKERT, V. A.; CASTRO, A. A. de; QUEVEDO, J.; DAL-PIZZOL, F. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with n-acetylcysteine, vitamins and statins. **Current Neurovascular Research**, v. 11, n. 1, p. 83-90, 2014.

STOLL, B. J.; HANSEN, N. I; SANCHEZ, P. J. et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. **Pediatrics**, v. 127, n. 5, p. 817-826, 2011.

SYME, H. M. Systemic Hypertension: The Silent Kidney Killer World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings. **Survival**, v. 154, p. 0.02, 2010.

TAKAKURA, A.; ZANDI-NEJAD, K. Lactate-induced activation of HCA2 improves survival in mice with sepsis. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 6, p. 7625-7634, 2019.

TATARANNO, M. L.; PERRONE, S.; BUONOCORE, G. Plasma Biomarkers of Oxidative Stress in Neonatal Brain Injury. **Clin Perinatol**. v. 42, n. 3, p. 529–39, 2015.

TIMLIN, H; WU, M.; CRESPO-BOSQUE, M. et al. Clinical Characteristics of Hydralazine-induced Lupus. **Cureus**, v. 11, n. 6, 2019.

TONIOLLI, R.; COSTA, J. M. da S. Espécies reativas ao oxigênio, antioxidantes e suas implicações na qualidade do sêmen criopreservado de mamíferos domésticos. **Investigação**, 16(8): 22-29, 2017.

TRZECIAK, S.; MCCOY, J. V.; DELLINGER, P. R. et al. Microcirculatory alterations in resuscitation and shock (MARS) investigators. Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 hours in patients with sepsis. **Intensive Care Med**, 34:2210---7, 2008.

TSAI, S. H.; LIN, Y. Y.; HSU, C. W. et al. Hypoglycemia revisited in the acute care setting. **Yonsei Medical Journal**, v. 52, n. 6, p. 898-908, 2011.

VALLEJOS, A.; OLIVARES, P.; GATICA, S. et al. Endotoxemia-induced endothelial fibrosis inhibition improves hypotension, tachycardia, multiple organ dysfunction syndrome, cytokine response, oxidative stress, and survival. **Laboratory Investigation**, v. 99, n. 8, p. 1173-1192, 2019.

VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, obesity and metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007.

WALLEY, K. R.; LUKACS, N. W.; STANDIFORD, T. J. et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infection and immunity**, v. 64, n. 11, p. 4733-4738, 1996.

WANG, F.; LEI, X.; ZHAO, Y. et al. Protective role of thymoquinone in sepsis-induced liver injury in BALB/c mice. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 18, n. 3, p.

1985-1992, 2019.

WANG, J. H.; CHE, D.; CHEN, D.; ZENG, Q. Y. Effect of Xingnaojing injection in myocardial mitochondrial oxidative stress injury in sepsis mice. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 9, n. 7, p. 14559-14563, 2016.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, v. 29, n. 2, p. 189-201, 1980.

XIA, S.; LIN, H.; LIU, H. et al. Honokiol attenuates sepsis-associated acute kidney injury via the inhibition of oxidative stress and inflammation. **Inflammation**, v. 42, n. 3, p. 826-834, 2019.

XIAO, H.; SIDDIQUI, J.; REMICK, D. G. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. **Infection and immunity**, v. 74, n. 9, p. 5227-5235, 2006.

XU, B.; MAKRIS, A.; THORNTON, C. et al. Anti-hypertensive drugs clonidine, diazoxide, hydralazine and furosemide regulate the production of cytokines by placentas and peripheral blood mononuclear cells in normal pregnancy. **Journal of hypertension**, v. 24, n. 5, p. 915-922, 2006.

XU, B.; THORNTON, C.; MAKRIS, A. et al. Anti-hypertensive drugs alter cytokine production from preeclamptic placentas and peripheral blood mononuclear cells. **Hypertension in Pregnancy**, v. 26, n. 3, p. 343-356, 2007.

XU, J.; MA, X.; YU, K. et al. Lactate up-regulates the expression of PD-L1 in kidney and causes immunosuppression in septic Acute Renal Injury. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. 2019.

YAN, J.; LI, S.; LI, S. The role of the liver in sepsis. **International Reviews of Immunology**, v. 33, n. 6, p. 498-510, 2014.

ZANOTTI-CAVAZZONI, S. L.; GOLDFARB, R. D. Animal models of sepsis. **Critical care clinics**, v. 25, n. 4, p. 703-719, 2009.

ZARBOCK, A.; GOMEZ, H.; KELLUM, J. A. Sepsis-induced acute kidney injury revisited. **Pathophysiology, prevention and future therapies**, v, p. 20, 2014.

ZEISBERG, E.; ZEISBERG, M. A rationale for epigenetic repurposing of hydralazine in chronic heart and kidney failure. **J. Clin. Epigenetics** 2, 5, 2016 2016.

ZHANG, D. W.; HE, J. Interleukin-6 is a key factor for immunoglobulin-like transcript-4-mediated immune injury in sepsis. **Journal of intensive care**, v. 6, n. 1, p. 22, 2018.

ZHENG, H.; FLETCHER, D.; KOZAK, W. et al. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 β -deficient mice. **Immunity**, v. 3, n. 1, p. 9-19, 1995.

ZHENG, Z.; MA, H.; ZHANG, X. et al. Enhanced glycolytic metabolism contributes to cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.

215, n. 9, p. 1396-1406, 2017.

ZHOU, R.; QU, Y.; HUANG, Q. et al. Recombinant CC16 regulates inflammation, oxidative stress, apoptosis and autophagy via the inhibition of the p38MAPK signaling pathway in the brain of neonatal rats with sepsis. **Brain Research**, v. 1725, p. 146473, 2019.

ZHOU, T.; SHI, J.; LI, X. Role of PI3K/Akt signaling pathway in the innate immune of sepsis. **Zhonghua wei zhong bing ji jiu yi xue**, v. 30, n. 11, p. 1091, 2018.

ANEXOS

ANEXO A – Certificados de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 COORDENAÇÃO DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito cardiovascular da hidralazina em modelos de sepsé", registrada com o nº 20/2017, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 12/06/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/09/2017, Término: 01/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico
Nº de animais	240
Peso/Idade	250-300g / 90 dias
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS

Josemar SENA BATISTA

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
 Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
 Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE
 49100-000
 Fones: 3212 6661/6606



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA HIDRALAZINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE", protocolada sob o CEUA nº 4923121119 (ID 000193), sob a responsabilidade de **Marcio Roberto Viana dos Santos e equipe; Danilo Menezes dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 02/03/2020.

We certify that the proposal "EVALUATION OF EFFECTS OF HYDRALAZINE ON THE EXPERIMENTAL SEPSE MODEL", utilizing 240 Heterogenics rats (240 males), protocol number CEUA 4923121119 (ID 000193), under the responsibility of **Marcio Roberto Viana dos Santos and team; Danilo Menezes dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 03/02/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **12/2019** a **12/2021**

Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Biotério do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular - LAFAC**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **240**

Linhagem: **Ratos Wistar**

Peso: **250 a 300 g**

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular - LAFAC em sala apropriada para realização de experimentos com animais.

São Cristóvão, 31 de agosto de 2020

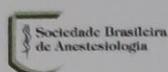
Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

ANEXO B – Artigo de Revisão Sistemática

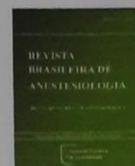
Qualis: B1

Rev Bras Anesthesiol. 2019;69(6):605-621



REVISTA
BRASILEIRA DE
ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



REVIEW ARTICLE

Association between peripheral perfusion, microcirculation and mortality in sepsis: a systematic review



Danillo Menezes dos Santos^a, Jullyana S.S. Quintans^a,
Lucindo J. Quintans-Junior^a, Valter J. Santana-Filho^b,
Cláudio Leinig Pereira da Cunha^c, Igor Alexandre Cortes Menezes^{c,*,}
Márcio R. Viana Santos^a

^a Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Fisiologia, São Cristóvão, SE, Brazil

^b Universidade Federal de Sergipe, Núcleo de Fisioterapia, Aracaju, SE, Brazil

^c Universidade Federal do Paraná, Hospital de Clínicas, Curitiba, PR, Brazil

Received 15 June 2019; accepted 7 September 2019

Available online 11 November 2019

KEYWORDS

Perfusion;
Microcirculation;
Mortality;
Sepsis;
Review

Abstract Although increasing evidence supports the monitoring of peripheral perfusion in septic patients, no systematic review has been undertaken to explore the strength of association between poor perfusion assessed in microcirculation of peripheral tissues and mortality. A search of the most important databases was carried out to find articles published until February 2018 that met the criteria of this study using different keywords: sepsis, mortality, prognosis, microcirculation and peripheral perfusion. The inclusion criteria were studies that assessed association between peripheral perfusion/microcirculation and mortality in sepsis. The exclusion criteria adopted were: review articles, animal/pre-clinical studies, meta-analyses, abstracts, annals of congress, editorials, letters, case-reports, duplicate and articles that did not present abstracts and/or had no text. In the 26 articles were chosen in which 2465 patients with sepsis were evaluated using at least one recognized method for monitoring peripheral perfusion. The review demonstrated a heterogeneous critically ill group with a mortality-rate between 3% and 71% (median = 37% [28%–43%]). The most commonly used methods for measurement were Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) (7 articles) and Sidestream Dark-Field (SDF) imaging (5 articles). The vascular bed most studied was the sublingual/buccal microcirculation (8 articles), followed by fingertip (4 articles). The majority of the studies (23 articles) demonstrated a clear relationship between poor peripheral perfusion and mortality. In conclusion, the diagnosis of hypoperfusion/microcirculatory abnormalities in peripheral non-vital organs was

* Corresponding author.
E-mail: igoracmenezes1@gmail.com (I.A. Menezes).

ANEXO C – Artigo Aceito para Publicação

Qualis: A1

Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches

The therapeutic value of hydralazine in reducing inflammatory response, oxidative stress and mortality in animal sepsis: involvement of the PI3K/AKT pathway
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	SHOCK-D-20-00743
Full Title:	The therapeutic value of hydralazine in reducing inflammatory response, oxidative stress and mortality in animal sepsis: involvement of the PI3K/AKT pathway
Short Title:	Therapeutic value of hydralazine in sepsis
Article Type:	Basic Science Aspects (Animal Subjects)
Keywords:	Cecal ligation and puncture; survival; immune response; cytokines; antioxidant
Corresponding Author:	Márcio Roberto Viana dos Santos, Ph.D. Universidade Federal de Sergipe São Cristóvão, Sergipe BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Sergipe
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Danillo Menezes dos Santos, Msc.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Danillo Menezes dos Santos, Msc. Eric Aian Pereira Jeferson Yuri Santos Oliveira Yandra Yssa de Menezes Marinho Izabel Rodrigues de Santana Luana Heimfarth Erik Willyame Menezes Pereira Lucindo José Quintans Júnior Jamil Assreuy Igor Alexandre Cortes Menezes Márcio Roberto Viana dos Santos, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Sepsis is characterized by an amplified systemic immune-inflammatory response produced by a microorganism. Its pathophysiological mechanism is complex and involves activation of inflammatory cytokine signaling pathways and oxidative stress. Due to high mortality in ICU patients, the scientific community has constantly sought specific therapies for sepsis treatment. Thus, the aim of this work was to evaluate therapeutic value of hydralazine in reducing inflammatory response, oxidative stress and mortality in animal sepsis, and to investigate its possible mechanism of action. Sepsis was induced by the cecal ligation and puncture (CLP) method in Wistar rats.

22/01/2021

Email – Danilo Menezes – Outlook

FW: Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches Decision - [EMID:52bd68f6f02bd1ed]

marciorsantos <marciorsantos@academico.ufs.br>

Sex, 22/01/2021 19:59

Para: danillo-menezes@hotmail.com <danillo-menezes@hotmail.com>

Enviado do meu Galaxy

----- Mensagem original -----

De : Mark Clemens <em@editorialmanager.com>

Data: 20/01/2021 09:26 (GMT-03:00)

Para: Márcio Roberto Viana dos Santos <marciorsantos@academico.ufs.br>

Assunto: Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches Decision - [EMID:52bd68f6f02bd1ed]

Jan 20 2021 07:23AM

Dear Dr. Santos

RE: SHOCK-D-20-00743R2, entitled The therapeutic value of hydralazine in reducing inflammatory response, oxidative stress and mortality in animal sepsis: involvement of the PI3K/AKT pathway

Thank you for sending your revised manuscript. It has been reviewed, and has been recommended for acceptance. Before we can proceed -- see below:

1. Co-authors Heimfarth and QuintansJunior must complete their eCTA questionnaires.
2. You have marked Yes to Open Access - download the form, complete, sign and upload back onto Editorial Manager.
3. Figures must be individually uploaded.

When the above items are corrected/completed, submit one clean, unmarked, no highlighted version of your final manuscript for processing.

We look forward to hearing from you and to receiving the final version of your manuscript within a few days.

OPEN ACCESS

If you would like your submission, if accepted, to be open access, please complete the following steps. An information sheet is available at <http://links.lww.com/LWW-ES/A48>.

<https://outlook.live.com/mail/0/inbox/id/AQMkADAwATZIZmYAZC1INTIhLTJmZTkMDACLTAwCgBGAAADgEQJB1o8zEqNPb4PuJ3%2F0QcA%2FmH...>

22/01/2021

Email – Danilo Menezes – Outlook

1. A License to Publish (LTP) form must be completed for your submission to be made open access. Please download the form from <http://links.lww.com/LWW-ES/A49>, sign it, and submit the file as part of your revision (using the Attach Files submission step in Editorial Manager).
2. Upon acceptance of your submission, within your Acceptance decision letter will be a payment link to complete the open access process. The cost for publishing an article as open access can be found at <http://edmgr.ovid.com/shk/accounts/ifauth.htm>.

Please note that corresponding authors from UKB institutions in the Netherlands should contact their library (<http://www.openaccess.nl/en/references/contacts>) for more information on their open access requirements.

Yours sincerely,
Mark Ciemens
Editor-in-Chief

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. ([Remove my information/details](#)). Please contact the publication office if you have any questions.