

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica**

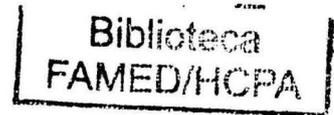
**Dosagem Sequencial de Fator de Necrose Tumoral Alfa,  
Seus Receptores Solúveis e Endotelina-1  
em Pacientes com Choque Séptico**

**Dissertação de Mestrado**

**Autora: Janete Salles Brauner**  
**Orientadora: Dra. Nadine Clausell**

**Porto Alegre, março de 1997**

## AGRADECIMENTOS



Agradeço a todos que me incentivaram nesta trajetória, fazendo com que conseguisse alcançar mais um dos meus objetivos.

Ao Dr. Sérgio Menna Barreto pela oportunidade de iniciar este caminho e a Dra. Nadine Clausell por permitir concluir o trabalho iniciado, através de sua idéias, incentivo, orientação, supervisão e principalmente sua amizade.

Aos médicos residentes da Terapia Intensiva Claidir de Paoli, Sérgio Monteiro Brodt, João Batista Sobrinho, Nestor E. Zuluaga, Ingrid Spier, Enf. Eneida Rabello e ao Dr. Carlos Mallmann Neto pelo seu precioso auxílio na coleta de dados.

^ A Dra. Karen Prado pelo seu carinho e amizade.

^ A equipe do Laboratório de Urgência do HCPA onde processei todas as amostras.

^ A equipe do Laboratório de Pesquisa do HCPA, em especial ao Dr. Jarbas de Oliveira e a Mônica pelo apoio e auxílio na realização dos testes ELISA.

Ao Laboratório de Imunologia do INCOR, em especial aos Drs. Kalil, Ana Carla e Karen pela supervisão, estímulo e paciência durante a extração da ET-1.

Aos meus pais pela minha formação e caráter.

Ao Orlofe por estar sempre presente em minha vida. ^ As minhas filhas Michelle, Karina, Carla e Melissa pelo seu carinho, amor e paciência durante todo este trajeto.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>INTRODUÇÃO</b>	
1. Seps e choque séptico.....	1
2. Aspectos inflamatórios na seps e	
2.1 Visão geral da cascata inflamatória.....	2
2.2 Ativação da cascata inflamatória aspectos celulares.....	5
2.3 Produtos biológicos - citocinas.....	7
2.3.1 Interleucina-1 (IL-1).....	10
2.3.2 Fator de Necrose Tumoral-alfa.....	10
2.3.3 Receptores do TNF-alfa.....	12
3. Disfunção cardíaca e modulação inflamatória na seps e.....	14
4. Disfunção vascular e mediadores biológicos na seps e.....	16
4.1 Endotelina.....	18
5. Indicadores prognósticos biológicos na seps e.....	21
<b>HIPÓTESE</b> .....	25
<b>OBJETIVOS</b> .....	25
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
1. População em estudo.....	26
2. Delineamento do estudo.....	26
3. Seleção da amostra.....	26
4. Colheita do material.....	28
4.1 Método de colheita.....	28
4.2 Método de dosagem plasmática dos marcadores.....	28
5. Análise estatística.....	29
6. Considerações éticas.....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	31
1. Características da amostra.....	31

1.1 Comparação das características clínicas entre os grupos sobreviventes e não sobreviventes.....	31
1.2 Comparação das características hemodinâmicas e de transporte de oxigênio entre sobreviventes e não sobreviventes.....	34
2. Otimização metodológica do ensaio ELISA.....	34
3. Concentração plasmática sequencial de TNF- $\alpha$ nos sobreviventes e não sobreviventes.....	38
4. Concentração plasmática sequencial de Rs1-TNF- $\alpha$ nos sobreviventes e não sobreviventes.....	40
5. Concentração plasmática sequencial de Rs2-TNF- $\alpha$ nos sobreviventes e não sobreviventes.....	42
6. Concentração plasmática sequencial de ET-1 nos sobreviventes e não sobreviventes.....	44
7. Risco relativo, sensibilidade, valor preditivo positivo, especificidade e valor preditivo negativo das concentrações de TNF- $\alpha$ , Rs1-TNF- $\alpha$ , Rs2-TNF- $\alpha$ e ET-1.....	46
7.1 Valor preditivo, sensibilidade e especificidade do TNF- $\alpha$ ou ET-1.....	47
7.2 Valor preditivo, sensibilidade e especificidade do TNF- $\alpha$ ou Rs1-TNF- $\alpha$ ..	47
7.3 Valor preditivo, sensibilidade e especificidade do Rs1-TNF- $\alpha$ ou ET-1.....	47
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
Considerações metodológicas.....	49
Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ e seus receptores .....	51
Concentração plasmática de ET-1 .....	53
Valor preditivo, sensibilidade e especificidade do TNF- $\alpha$ ou ET-1, TNF- $\alpha$ ou Rs1-TNF- $\alpha$ e Rs1-TNF- $\alpha$ ou ET-1 .....	56
Limitações do estudo.....	57
Síntese.....	57
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>ESTUDOS COMPLEMENTARES.....</b>	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>60</b>

## RESUMO

**Introdução:** Apesar dos avanços na terapia antimicrobiana, cuidados intensivos e técnicas cirúrgicas não houve alteração nos últimos anos da morbimortalidade na sepse ou choque séptico. Dentre os vários mediadores inflamatórios envolvidos na sepse, as citocinas ocupam lugar chave na patogênese do choque séptico, muitas vezes com efeitos biológicos opostos, como fator de necrose tumoral-alfa e a endotelina-1. Além disso, há um grande interesse nos níveis circulantes destas citocinas pela possibilidade de identificar pacientes de alto risco na síndrome séptica. Entretanto, o valor preditivo dos níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral-alfa, de seus receptores solúveis e, particularmente da endotelina-1 não está definido, principalmente quando analisado precocemente no choque séptico.

**Objetivo:** Avaliar a evolução sequencial dos níveis plasmáticos de fator de necrose tumoral-alfa, receptor solúvel-1 do fator de necrose tumoral-alfa, receptor solúvel-2 do fator de necrose tumoral-alfa e endotelina-1 imediatamente após a colocação de cateter em artéria pulmonar durante 24 horas, nos intervalos de 0, 6, 12 e 24 horas e determinar o valor preditivo dos níveis plasmáticos obtidos destes mediadores em pacientes com choque séptico.

**Métodos:** Foram estudados 23 pacientes com choque séptico definido pelos critérios do American College of Chest Physicians/Critical Care Society no período de 14 de março a 31 de agosto de 1996, sendo excluídos dois pacientes. Foram coletadas amostras de sangue em átrio direito através da porção proximal do cateter colocado em artéria pulmonar nos momentos de 0, 6, 12 e 24 horas. As amostras foram centrifugadas e armazenadas a menos 20°C. Posteriormente foram analisados, pelo método ELISA, os níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral-alfa, dos receptores solúveis-1 e 2 do fator de necrose tumoral-alfa

e endotelina-1, bem como as características clínicas e hemodinâmicas dos pacientes da amostra. Após os pacientes foram divididos em sobreviventes e não sobreviventes.

**Resultados:** O grupo de não sobreviventes (n=10) apresentou valores significativamente mais elevados que os sobreviventes (n=11) para a idade ( $64,5 \pm 16,6$  versus  $43,7 \pm 12,8$  anos), APACHE II ( $27,7 \pm 4,9$  versus  $18,2 \pm 3,7$ ), disfunção orgânica múltipla ( $3,7 \pm 0,9$  versus  $2,7 \pm 0,9$ ) e predominância do sexo masculino (7 versus 2). Não houve diferença significativa entre o tempo de choque prévio à entrada no estudo, valores hemodinâmicos e de transporte de oxigênio entre sobreviventes e não sobreviventes. Ambos os grupos apresentaram médias mais elevadas de todos os marcadores biológicos estudados comparados aos valores de referência. Entretanto no momento das 6 horas houve aumento significativo nos não sobreviventes em relação aos sobreviventes para o fator de necrose tumoral-alfa, receptor solúvel-1 do fator de necrose tumoral-alfa e endotelina-1, sendo o valor preditivo positivo destes mediadores para mortalidade de 70%, 66,7% e 72,7%, respectivamente. Além disto, a presença de fator de necrose tumoral-alfa maior do que 15,5 pg/ml ou endotelina-1 maior do que 27,8 pg/ml, em pacientes com choque séptico, mostrou sensibilidade e valor preditivo negativo de 100%.

**Conclusão:** Neste estudo caracterizamos o comportamento temporal de vários mediadores biológicos em um período de 24 horas através de medidas sequenciais de 6 em 6 horas entre as coletas. Demonstramos que os níveis destas citocinas estão aumentados em todos os pacientes com choque séptico, porém com concentrações plasmáticas significativamente mais elevadas em pacientes não sobreviventes, em especial no momento das 6 horas. Além disso, a endotelina-1 parece ser um fiel marcador para pacientes de alto risco para mortalidade em choque séptico, pois não apresenta falsos negativos.

**Palavras-chave:** sepse; citocinas; prognóstico.

## ABSTRACT

**Introduction:** Despite advances in antimicrobial therapy, intensive care and aggressive surgical approach, no significant improvement is apparent in morbidity and mortality in patients with sepsis or septic shock in late years. Among the various inflammatory mediators involved in the pathogenesis of sepsis, cytokines featuring opposite hemodynamic effects - vasodilation and vasoconstriction, such as tumor necrosis-alpha and more recently endothelin-1 appear to play important roles. Furthermore, there is growing interest to determine the ability of circulating levels of these cytokines to identify high-risk patients with sepsis syndrome. However, the predictive role of circulating levels of tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors, and particularly those of endothelin-1 remain partially understood, particularly when analyzed early in the course of septic shock.

**Objectives:** To sequentially assess plasma levels of tumor necrosis-factor-alpha, soluble receptor 1 and 2 for tumor necrosis-factor-alpha and endothelin-1 immediately after insertion of pulmonary artery catheter for 24 hours with 6 hours time interval in patients with septic shock and determine the predictive value of the levels obtained.

**Methods:** Twenty-three patients with septic shock according the criteria of the American College Of Chest Physicians/Critical Care Society were studied from March 14 to August 31, 1996; two patients were subsequently excluded. Blood samples were collect from the right atrium using the pulmonary artery catheter at 0, 6, 12 and 24 hours. Samples were centrifugated and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for subsequent combined analysis by ELISA of tumor necrosis factor-alpha, soluble receptor 1 and 2 for tumor necrosis factor-alpha and endothelin-1. Clinical and hemodynamic variables were also recorded, and at the end of the study the patient population was then divided in survivors and non survivors.

**Results:** Non survivors (n=10) had significantly higher values for age ( $64,5 \pm 16,6$  versus  $43,7 \pm 12,8$  years), APACHE II ( $27,7 \pm 4,9$  versus  $18,2 \pm 3,7$ ), multiple organ dysfunction syndrome  $3,7 \pm 0,9$  versus  $2,7 \pm 0,9$ ) and male predominance (7 versus 2)

compared to survivors (n=11). There are no significant differences relative to hours in shock previous to study entry, hemodynamic values and oxygen delivery and consumption between survivors and non survivors. Both groups had high levels of the inflammatory markers studied compared to reference values. Furthermore, at 6 hours there were significant increase in the levels of tumor necrosis factor-alpha, soluble receptor 1 for tumor necrosis factor-alpha and endothelin-1 in non survivor patients compared to survivors; this pattern indicated positive predictive value for mortality of 70%, 66,7% and 72.7% for these markers, respectively. Also, tumor necrosis factor-alpha higher than 15,5 pg/ml or endothelin-1 higher than 27,8 pg/ml in patients with septic shock had both sensivity and negative predictive value of 100% for mortality.

**Conclusions:** In this study we characterized the temporal pattern of four different cytokines in patients with septic shock during 24 hours with 6 hours time interval between sample collections. We demonstrated that cytokine levels were increased in all patients, but significant higher values were observed in non survivor patients compared to survivors, specially in the early time points (6 hours). Furthermore, we also showed that endothelin-1 appeared to be the most reliable marker for high risk patients since it had no false negative cases

**Key words:** sepsis, cytokines, prognosis.

## ABREVIATURAS

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral
<b>IL</b>	interleucina
<b>PAF</b>	fator ativador das plaquetas
<b>PMN</b>	polimorfonuclear
<b>NADPH</b>	nicotinamina fosfato desidrogenase
<b>LPS</b>	lipolissacarídeo
<b>TGF <math>\beta</math></b>	fator transformador de crescimento
<b>PECAM</b>	molécula de adesão plaquetária
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>mRNA</b>	mensageiro do ácido ribonucleico
<b>Rs-TNF</b>	receptor solúvel do fator de necrose tumoral
<b>IL-1RA</b>	antagonista do receptor da interleucina-1
<b>IFN</b>	interferon
<b>PAI</b>	inibidor ativador do plasminogênio
<b>ELAM</b>	molécula de adesão leucócito-endotelial
<b>ICAM</b>	molécula de adesão intercelular
<b>VCAM</b>	molécula de adesão vascular
<b>GPM</b>	grânulo de proteína associado a membrana
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NOS</b>	sintase do óxido nítrico
<b>eNOS</b>	sintase constitutiva do óxido nítrico
<b>bNOS</b>	sintase cerebral do óxido nítrico
<b>iNOS</b>	sintase indutiva do óxido nítrico
<b>DNA</b>	ácido desoxiribonucleico
<b>GMPc</b>	3'5' monofosfato cíclico de guanosina
<b>O<sub>2</sub></b>	oxigênio
<b>DMOS</b>	disfunção múltipla de órgãos e sistemas
<b>CTI</b>	centro de Terapia Intensiva
<b>HCPA</b>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Nota: várias siglas foram mantidas conforme a língua inglesa por serem assim conhecidas universalmente.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Ativação direta e indireta da cascata inflamatória.....	4
Figura 2 - Balanço inflamatório.....	9
Figura 3 - Valores plasmáticos da dosagem sequencial de TNF- $\alpha$ em pacientes com choque séptico.....	39
Figura 4 - - Valores plasmáticos da dosagem sequencial de Rs1-TNF- $\alpha$ em pacientes com choque séptico.....	41
Figura 5 - - Valores plasmáticos da dosagem sequencial de Rs2-TNF- $\alpha$ em pacientes com choque séptico.....	43
Figura 6 - - Valores plasmáticos da dosagem sequencial de ET-1- em pacientes com choque séptico.....	45

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Características clínicas da amostra: Sobreviventes.....	32
Tabela 2 - Características clínicas da amostra: Não sobreviventes.....	33
Tabela 3 - Comparação das características hemodinâmicas e de transporte de oxigênio entre sobreviventes, no horário das 6 horas.....	34
Tabela 4 - Comparação das características hemodinâmicas e de transporte de oxigênio entre não sobreviventes, no horário das 6 horas.....	35
Tabela 5 Comparação das concentrações, em pg/ml, entre voluntários normais, sobreviventes e não sobreviventes para os diversos marcadores.....	37
Tabela 6 - Comparação da dosagem sequencial do TNF- $\alpha$ , entre sobreviventes e não sobreviventes (médias ( $\pm$ ) erro padrão).....	38
Tabela 7 - Comparação da dosagem sequencial do Rs1-TNF- $\alpha$ , entre sobreviventes e não sobreviventes (médias ( $\pm$ ) erro padrão).....	40
Tabela 8 - Comparação da dosagem sequencial do Rs2-TNF- $\alpha$ , entre sobreviventes e não sobreviventes (médias ( $\pm$ ) erro padrão).....	42
Tabela - 9 Comparação da dosagem sequencial do ET-1, entre sobreviventes e não sobreviventes (médias ( $\pm$ ) erro padrão).....	44
Tabela 10 - Comparação entre os pontos de corte, risco relativo, valores preditivos, sensibilidade e especificidade do TNF- $\alpha$ , Rs1-TNF- $\alpha$ e ET-1.....	46

## INTRODUÇÃO

### 1. Seps e choque séptico

Seps e choque séptico são causas significativas de morbimortalidade. Nos Estados Unidos estima-se que haja 500.000 novos episódios de seps por ano associados com mortalidade de 35%. O choque aparece em 40% dos pacientes com seps e afeta adversamente o prognóstico. Entre os pacientes hospitalizados em Centro de Terapia Intensiva (CTI) geral, a seps é referida como a principal causa de morte. Apesar dos progressos na terapia antimicrobiana, cuidados intensivos e técnicas cirúrgicas, não houve alteração significativa da morbimortalidade em seps ou choque séptico nos últimos 30 anos<sup>1</sup>.

Vários são os fatores que influenciam a sobrevida em pacientes com seps ou choque séptico. Numerosos estudos publicados nas últimas duas décadas apontam como maiores determinantes de mortalidade a gravidade da doença subjacente do paciente, sua idade, débito urinário e pH arterial valorizando predominantemente o estado fisiológico do paciente como o maior fator de risco. Há também controvérsias sobre quais as citocinas, bioprodutos inflamatórios sabidamente envolvidas no complexo biológico da seps, que são capazes de identificar mais acuradamente os pacientes de risco. Por exemplo, os níveis séricos de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1) estão igualmente associados com mau prognóstico<sup>2</sup>.

A patogenia do choque séptico é complexa, mas estudos recentes tem sugerido uma sequência de eventos. Os organismos se multiplicam em um sítio infectado onde proliferam e produzem exotoxinas ou endotoxinas. Estes produtos são capazes de induzir uma resposta do sistema imune do hospedeiro, que elabora um número importante de mediadores tais como as citocinas (interleucinas, TNF- $\alpha$ ), eicosanoides, componentes do complemento, cininas, fator ativador das plaquetas (PAF) e outros mediadores que podem produzir profundos efeitos na vasculatura, no miocárdio e em outros órgãos. Se esta

cascata não for interrompida haverá insuficiência cardiovascular progressiva, depressão miocárdica, hipotensão arterial com redução do tonus vascular sistêmico e má distribuição do fluxo sanguíneo. Os pacientes então irão ao óbito por hipotensão refratária ou disfunção orgânica múltipla<sup>3</sup>.

## **2) Aspectos inflamatórios na sepse**

### **2.1 Visão geral da cascata inflamatória**

A inflamação é essencialmente uma resposta adaptativa do organismo à agressão, numa tentativa de promover a cicatrização e a cura, aumentando sua capacidade de luta inclusive contra a infecção. Seguindo-se à agressão, o hospedeiro é exposto imediatamente a um número de substâncias pró-inflamatórias derivadas tanto de fontes endógenas como exógenas, sendo a bactéria a fonte exógena mais frequente<sup>4</sup>.

Quando há invasão de microorganismos, estes liberam moléculas específicas (endotoxinas no caso de microorganismos Gram negativos e ácido teicóico no caso de organismos Gram positivos) que servem como um gatilho da resposta do hospedeiro com desencadeamento da resposta inflamatória. A natureza celular e molecular complexa do microorganismo, que inclui uma região polissacarídica e uma camada de lipídio A, é responsável pela ativação direta de células (fagócitos, células endoteliais, linfócitos, fibroblastos, etc), do complemento e pela ativação indireta da cascata inflamatória por induzir a produção de citocinas por macrófagos e monócitos<sup>5</sup>.

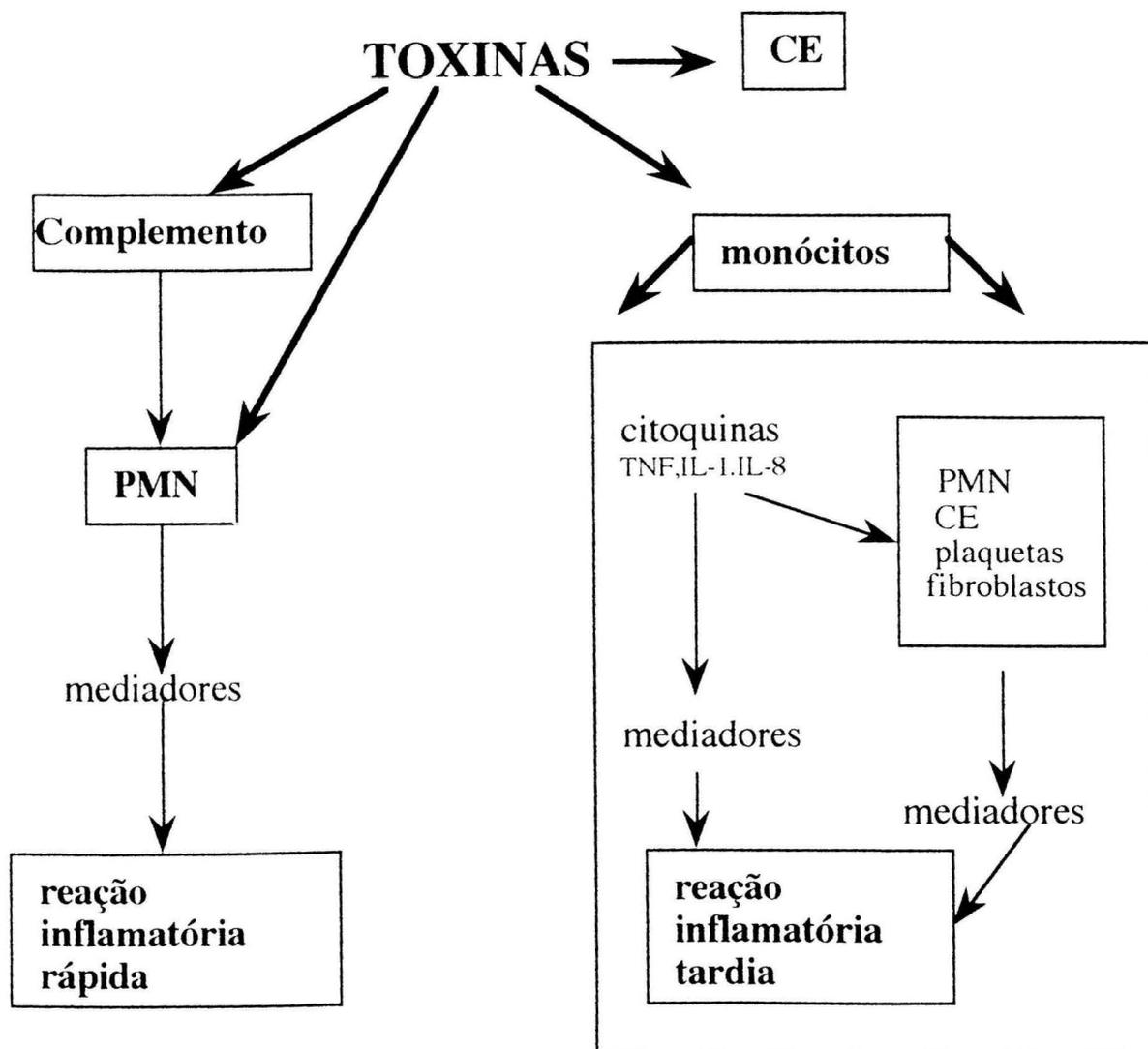
As citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 e o fator estimulador da colônia granulócito-monócito estão entre os primeiros mediadores a serem liberados juntamente com a anafilotoxina C5 (um produto da ativação da via alternativa do complemento). Estes mediadores rapidamente disparam uma resposta celular intensa, com liberação de mediadores secundários (citocinas, fragmentos do complemento, prostanoídes, espécies ativas de oxigênio, moléculas de adesão, etc), quimiotaxia e ativação

de granulócitos. Os segundos mediadores são responsáveis tanto pela reativação das células fagocíticas como da cascata inflamatória, disseminando esta resposta <sup>5</sup>. Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias modulam a resposta inflamatória e podem auxiliar no reparo tecidual. Estes mediadores anti-inflamatórios incluem o fator transformador de crescimento  $\beta$ , IL-4, IL-10 e o antagonista do receptor da IL-1 (rIL-1) <sup>6</sup>.

É possível especular que o balanço entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias seja um fator determinante da evolução ou não para disfunção orgânica múltipla, choque e óbito. A interação entre os mediadores da resposta inflamatória e anti-inflamatória pode ser vista como uma batalha entre forças opostas, sendo que na sepse há predomínio da resposta inflamatória <sup>7</sup>, no entanto isto não foi demonstrado experimental ou clinicamente.

Em resumo, como alguns destes mediadores podem afetar sua própria liberação e a de outros mediadores, a síndrome da resposta inflamatória sistêmica é capaz de sustentar sua própria existência. Este é um dos motivos pelos quais as tentativas de cura da sepse através da eliminação dos patógenos infectantes tem sido falha, pois é incapaz de interferir com a cascata da liberação de mediadores <sup>8</sup> (Figura 1).

**Fig.1 Ativação direta e indireta da cascata inflamatória**



**Figura 1. Ativação direta e indireta da cascata inflamatória.** . O estímulo por toxinas leva a uma reação inflamatória através da ativação do complemento, células endoteliais e monócitos. Isto produz uma maior produção de citocinas. Sua atuação sobre os polimorfonucleares desencadeia uma resposta inflamatória rápida. Os monócitos ativados atuam sobre os outros componentes celulares levando a uma reação inflamatória tardia.

**Abreviaturas:** CE- célula endotelial; PMN- polimorfonuclear; TNF- fator de necrose tumoral; IL-1 -interleucina 1; IL-8 -interleucina 8

## 2.2 Ativação da cascata inflamatória - aspectos celulares

As maiores fontes de mediadores inflamatórios endógenos incluem os mastócitos, macrófagos fixados aos tecidos, monócitos circulantes, polimorfonucleares (PMN), plaquetas e células endoteliais. Os mediadores liberados por estas células promovem o influxo de elementos celulares por alteração da permeabilidade vascular e por dirigir tipos específicos celulares aos sítios de injúria. O aumento da permeabilidade capilar secundário à liberação de histamina, bradicinina e prostaglandinas resulta em exposição das proteínas "blood-borne" aos agentes pró-inflamatórios, causando ativação das cascatas de coagulação e de contato (cininas) <sup>4</sup>.

Os neutrófilos estão separados em tres compartimentos dentro do organismo: medula óssea, compartimento intravascular e intersticial. Mais de dois terços das células dentro do sangue formam um estoque não circulante chamado de "marginado" ou "sequestrado". Durante a fase inicial da resposta inflamatória, os neutrófilos dentro do espaço vascular são expostos aos mediadores inflamatórios presentes na circulação, incluindo citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1, fragmentos de complemento ou lipopolissacarídeo (LPS), ou produtos sintetizados localmente (incluindo citocinas tais como IL-8 e PAF, que é um dos produtos do metabolismo do ácido araquidônico), tornando os neutrófilos marcadamente mais adesivos ao endotélio. Esta aderência pode ser crítica para iniciar o dano tecidual e fatores adicionais como hipóxia e a exposição aos agentes inflamatórios podem induzir liberação de grandes quantidades de produtos tóxicos, resultando em dano tecidual progressivo com disfunção orgânica múltipla <sup>9</sup>.

Por sua vez, na presença de inflamação, as células circulantes são mais rapidamente mobilizadas, mas também aquelas da medula óssea podem ser liberadas em resposta ao estresse, inclusive as formas imaturas que são menos deformáveis. Após as alterações relacionadas às modificações mecânicas, segue-se uma fase de marginação e sequestração dos leucócitos dentro dos leitos microvasculares tornando-os firmemente aderidos ao endotélio através de pontes com moléculas tais como fibronectina, fibrina e

fragmentos do complemento. Esta forte adesão entre os neutrófilos e as moléculas alvo é necessária para que possa ocorrer efeito citotóxico<sup>9, 10</sup>.

Também a transmigração dos neutrófilos do espaço vascular para os tecidos, envolvendo interação dos aminoglicanos da membrana plasmática dos neutrófilos com a molécula de adesão endotelial plaquetária (PECAM-1), é regulada por mediadores inflamatórios e por produtos das células residentes (macrófagos e fibroblastos). As alterações estruturais e bioquímicas dos neutrófilos levam a liberação de mediadores tóxicos pelos leucócitos ativados, incluindo espécies reativas de oxigênio através da queima oxidativa e secreção de enzimas proteolíticas potencializando o dano tecidual<sup>9</sup>.

Os macrófagos são importantes em iniciar uma resposta imune, pois os pequenos fragmentos de peptídeos gerados das proteínas microbianas associam-se a moléculas carreadoras, formando um complexo histocompatível. Quando o macrófago faz contato com um linfócito T que possua receptores que reconheça o complexo de combinação, o receptor da célula T liga-se a este complexo e o linfócito torna-se ativado, ou seja, o linfócito multiplica-se e libera uma série de linfocinas que regulam a função de outras células de defesa, incluindo os macrófagos e linfócitos T e B. Em resumo, os macrófagos e monócitos são responsáveis pela detecção precoce da endotoxina durante a sepsis e a indução resultante da resposta imune envolvendo o complexo leucócito-humoral<sup>11</sup>.

Há também uma contribuição ativa do endotélio nessas interações adesivas através da síntese e expressão adicional de moléculas de adesão endotelial, incluindo a molécula de adesão intercelular (ICAM 1 e 2), as selectinas e as integrinas. As modificações das propriedades biofísicas, as interações de adesão entre as glicoproteínas na superfície dos neutrófilos e ligandos do endotélio contribuem para retenção de neutrófilos na microvasculatura favorecendo o dano tecidual<sup>9</sup>.

Finalmente, a célula endotelial também participa ativamente na resposta inflamatória. A célula endotelial vascular possui propriedade contrátil, além de elaborar e incorporar substâncias glicoproteicas à sua membrana e liberar mediadores inflamatórios

por exocitose. As alterações na morfologia celular que ocorrem durante a exposição aos mediadores inflamatórios são acompanhadas por aumento da permeabilidade capilar, aderência e emigração dos leucócitos. Os mediadores liberados no sítio inflamatório são capazes de alterar a caracterização da membrana proteica da célula endotelial e aumentar marcadamente a aderência dos polimorfonucleares<sup>4</sup>.

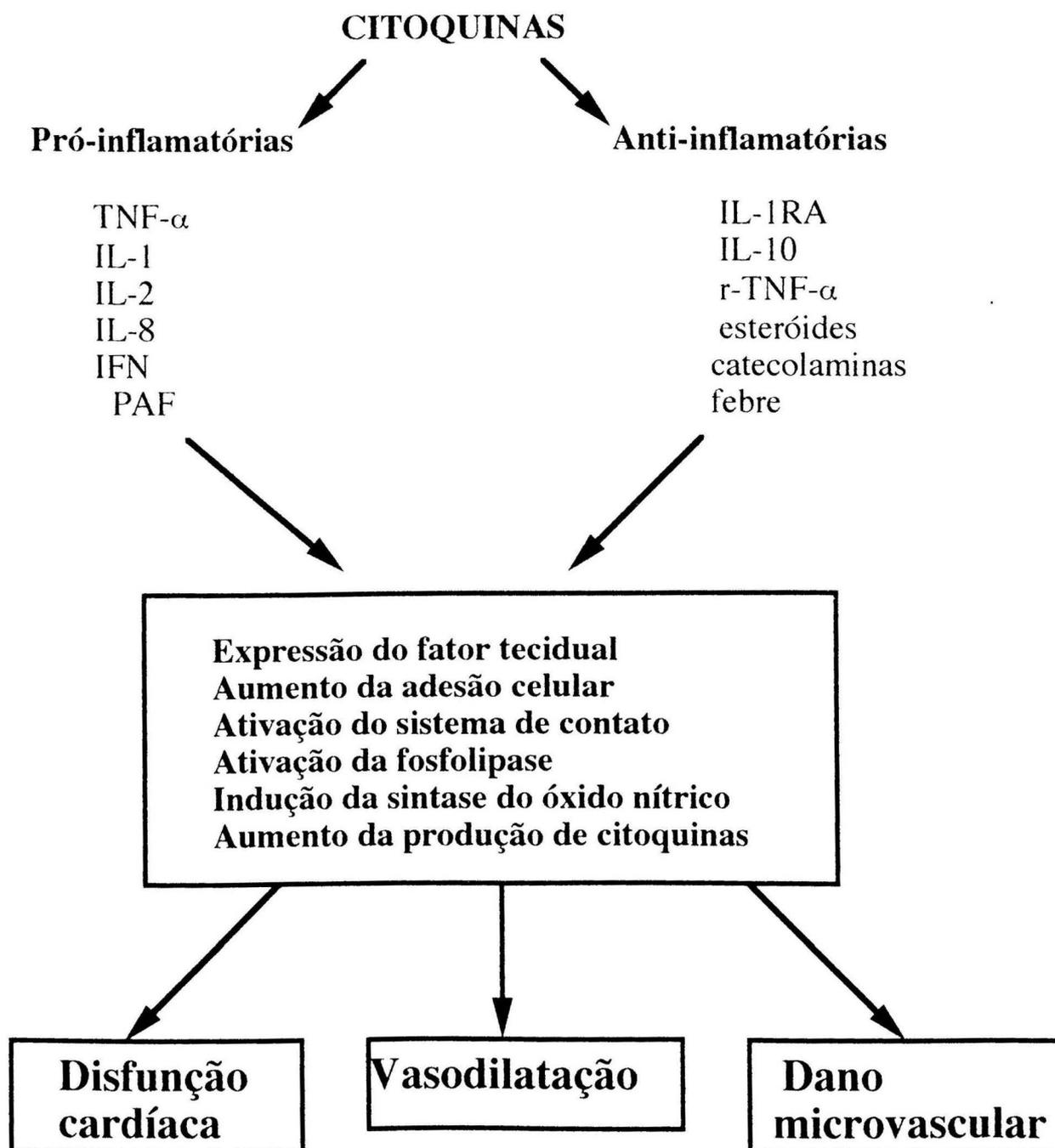
### **2.3. Produtos biológicos - citocinas**

As citocinas são moléculas bioativas que mediam a resposta do hospedeiro ao estímulo inflamatório e podem ser vistas como um meio de comunicação entre os leucócitos e as células endoteliais e também, entre as outras células. As citocinas são pequenas proteínas com atividade autócrina, parácrina e endócrina. Numerosos processos moleculares são necessários para que as citocinas exerçam seus efeitos. Inicialmente as células inflamatórias recebem estímulos de naturezas diversas, detectado através dos receptores da superfície celular. A informação detectada na superfície celular é transduzida intracelularmente, e o mecanismo de produção do mensageiro RNA e a síntese proteica são iniciadas. Quando as citocinas são secretadas, elas ligam-se a receptores específicos no tecido-alvo, e estes receptores elaboram sinais que alteram o fenótipo e as respostas das células-alvo. Cada um destes passos é fortemente controlado e pode servir como alvo de manipulação terapêutica<sup>12</sup>.

As citocinas exercem seus efeitos em baixas concentrações moleculares por interações altamente específicas com os receptores de superfícies celulares. As respostas específicas das células às citocinas são determinadas em parte pelo reservatório de receptores expressos naquelas células. Estes receptores são dependentes do tipo de célula-alvo e seu estágio de diferenciação e ativação. O nível de expressão de superfície dos receptores das citocinas é determinado pela taxa de inserção de receptores dentro da membrana plasmática (por síntese ou reciclagem) e pela perda de receptores (por difusão ou internalização)<sup>13</sup>.

As citocinas mais bem estudadas durante a endotoxemia são as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e a IL-1. Além destes, outros mediadores pró-inflamatórios são sintetizados e secretados como a IL-6, a IL-8 e o PAF. Também os fatores antiinflamatórios IL-10, catecolaminas e glicocorticoides são secretados, assim como os receptores solúveis do TNF- $\alpha$  (Rs-TNF) e da IL-1 (IL-1RA). Embora estes agentes não sejam intrinsecamente anti-inflamatórios, eles podem modular as atividades biológicas das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1. No choque séptico e outras desordens inflamatórias agudas, o resultado final da biosíntese de citocinas está inadequadamente controlado e pode ter mórbidas consequências como disfunção orgânica múltipla <sup>14</sup>.

A expressão de alguns receptores parece ser constitutiva e a expressão de outros receptores de citocinas pode ser regulada para cima ou para baixo após a exposição à ligandos específicos, ou pela ativação de vias de sinalização intracelular por outras citocinas <sup>12</sup>. Particularmente, o papel e o significado dos receptores solúveis ainda não está completamente definido (Figura 2).



**Figura 2. Balanço inflamatório.** Após estímulo inflamatório são produzidas citocinas pré e pró inflamatórias. Se houver um desequilíbrio com maior produção de citocinas pró-inflamatórias haverá aparecimento de disfunção cardíaca, vasodilatação e dano microvascular.

**Abreviaturas:** TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral; IL-1 - interleucina 1; IL-2:-interleucina 2; IL-8 -interleucina 8; IL-10 - interleucina 10; IL-1RA -receptor da interleucinal; IFN -interferon

### 2.3.1. Interleucina-1 (IL-1)

A IL-1 é o termo utilizado para duas proteínas relacionadas que são a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estas duas moléculas ativam os mesmos receptores celulares para a IL-1 e, dessa maneira, compartilham várias ações biológicas<sup>15</sup>. Por exemplo, a IL-1- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são consideradas citocinas pró-inflamatórias por apresentarem propriedades pró-inflamatórias semelhantes ao TNF- $\alpha$ , sendo que a produção de IL-1 é estimulada pelo TNF- $\alpha$  e a IL-1, por sua vez, potencializa muitos dos efeitos do TNF- $\alpha$ <sup>16</sup>.

A IL-1 é um polipeptídeo produzido por numerosas células como monócitos, macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas, linfócitos B, astrócitos e micróglia do sistema nervoso e células mesangiais do rim. A IL-1 é um importante mediador da resposta da fase aguda do estresse. Dessa maneira, suas ações incluem indução de febre e estimulação da síntese hepática das proteínas da fase aguda e podem afetar uma grande variedade de tecidos<sup>17</sup>. A IL-1 $\beta$  é a forma predominante de mediador produzido pelos monócitos humanos estimulados pela endotoxina, não sendo normalmente presente no plasma, porém é detectada no plasma de animais e pacientes com sepse<sup>18</sup>.

Com relação ao seu comportamento na sepse, estudos em animais mostraram que a injeção de toxina resultou no aparecimento de síndrome de choque com níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-1<sup>19</sup> e que a infusão de IL-1 em humanos causou febre, anormalidades hemodinâmicas, anorexia, mal estar, artralgia, cefaléia e neutrofilia<sup>18</sup>.

### 2.3.2 - Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

As células derivadas da linhagem dos monócitos e macrófagos são as principais fontes de TNF- $\alpha$ , mas este também pode ser produzido pelas células gliais, mastócitos, pelas células de transcrição nuclear (NK cells), células linfocíticas B e T, e ceratinócitos da pele. Por outro lado fatores endógenos e exógenos produzidos por bactérias, vírus, parasitas e tumores são capazes de induzir as células a produzirem TNF- $\alpha$ <sup>20</sup>.

Por exemplo, em modelos de sepse, ficou demonstrado que o TNF é produzido em grande quantidade pelos macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios como o LPS e liga-se a receptores presentes virtualmente em todas as células do organismo. Os macrófagos quando expostos ao LPS aumentam cerca de tres vezes a taxa transcricional dos genes nos macrófagos, sendo parte desta transcrição mediada pelo fator de transcrição nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), que está normalmente presente no citoplasma, até receber um sinal na superfície celular. O TNF é liberado sistemicamente quase que imediatamente após qualquer insulto, modificando as propriedades das células endoteliais, ativando neutrófilos e induzindo a liberação de outras citocinas. A combinação destes efeitos culmina com o colapso cardiovascular<sup>12</sup>.

O TNF pertence a uma família de ligandos que ativam os receptores estruturalmente relacionados. Estes sinais são referidos para o desenvolvimento normal e função do sistema imune. Mutações dos genes correspondentes aos ligandos e receptores podem causar distúrbios dos linfócitos, desarranjo do sistema imune ou doença autoimune<sup>20</sup>.

O TNF- $\alpha$  exerce muitos efeitos diretos ou indiretos, por exemplo, sobre as células endoteliais, e estes efeitos podem modificar vários sistemas:

1) Coagulação : o TNF- $\alpha$  induz a atividade pró-coagulante das células endoteliais através da liberação do PAF e fator de von Willebrand favorecendo a trombose. Ao mesmo tempo, regula para baixo a expressão de trombomodulina que bloqueia a interação dos complexos de proteína C/proteína S, diminuindo as propriedades anticoagulantes da superfície das células endoteliais. Controla também a fibrinólise, pela via de modulação dos inibidores-ativadores do plasminogênio e ativador do plasminogênio tecidual. Supõe-se que estes efeitos pró-coagulantes sirvam para isolar o local de infecção do sistema circulatório<sup>21</sup>.

2) Adesão celular: o TNF- $\alpha$  regula para cima todas as moléculas de adesão celular ou as expressa *de novo* na superfície das células endoteliais. Entre as moléculas de adesão, o ICAM-1 media a adesão de vários leucócitos. Outros elementos sanguíneos, tais como as

plaquetas, via ICAM-1 impedem o fluxo sanguíneo promovendo a coagulação. Também o TNF- $\alpha$  pode modificar a forma e/ou afinidade das moléculas de superfície celulares ou, em outros casos reduzir a expressão das moléculas de adesão <sup>22</sup>.

3) Quimiotaxia/Transmigração: *In vivo*, o TNF- $\alpha$  causa marginação dos neutrófilos, e durante a inflamação, a adesão é acompanhada de migração celular transendotelial, podendo haver desequilíbrio entre estes dois fenômenos. Pode haver apenas o fenômeno de adesão, durante a inflamação, levando ao sequestro intravascular. Alternativamente, também pode ocorrer apenas o fenômeno de migração, sem moléculas de adesão presentes <sup>20</sup>.

4) Outros efeitos na vasculatura: O TNF- $\alpha$  aciona a liberação de prostaglandina E<sub>2</sub>, prostaciclina I<sub>2</sub>, tromboxane A<sub>2</sub> e óxido nítrico (o qual exerce efeito vasodilatador) e endotelina (potente vasoconstritor) das células endoteliais. Estes mediadores podem exercer efeitos conflitantes e, a principal influência do TNF- $\alpha$  dependerá da localização onde é produzido e o leito vascular com o qual ele interage <sup>21</sup>.

### 2.3.3. Receptores do TNF- $\alpha$

O TNF- $\alpha$  liberado dentro da circulação após endotoxemia parece ocorrer em um padrão estereotipado. Após endotoxina endovenosa há um pico de TNF- $\alpha$  em torno de 90 a 120 minutos, o qual desaparece em aproximadamente em 4 a 6 horas. O TNF- $\alpha$  desaparece do soro em dois espaços funcionais: a) ligando-se aos receptores do TNF- $\alpha$  e às proteínas solúveis ligadas ao TNF- $\alpha$  e b) pelo "clearance" da proteína pelos rins e fígado <sup>20</sup>.

Acredita-se que toda a família de receptores-TNF- $\alpha$  seja de proteínas transmembrana que consistem de duas subunidades idênticas. A família é definida por um aminoácido rico em cisteína que se repete de tres a seis vezes na região extracelular. Tem sido descrito até o momento que o TNF possui dois receptores com afinidade similar: o receptor 55kd (Rs1-TNF- $\alpha$ ) e o receptor 75kd (Rs2-TNF- $\alpha$ ) <sup>23</sup>. Os dois receptores estão presentes virtualmente em todos os tipos de células, exceto as células vermelhas. A região

extracelular do receptor é que o define como parte da família, mas as estruturas intracitoplasmáticas não são homólogas, sugerindo que os dois receptores utilizem vias separadas para a transdução intracelular. As vias que são ativadas pelo Rs2-TNF- $\alpha$  (75 kd) são desconhecidas, mas os sistemas de segundo mensageiro, para o Rs1- TNF- $\alpha$ , incluem a proteinocinase C, fosfolipase A2, esfingomielinase e fosfolipase fosfatidilcolina-específica. O complexo ligando-receptor TNF é internalizado e metabolizado, mas como isso ocorre e como é expressa a sua bioatividade é incerta, uma vez que esta pode ser expressa na ausência de internalização ou por ligação com anticorpos anti-receptores<sup>20</sup>.

As interação entre o TNF- $\alpha$  e seus receptores são presumivelmente interações típicas entre pares de receptor-ligando nestas duas famílias moleculares. Os ligandos triméricos da família TNF podem causar agregação das subunidades dos receptores, dessa maneira disparando uma resposta celular, desde que anticorpos contra os dois receptores do TNF- $\alpha$  mimetizam ações do TNF- $\alpha$ . No entanto, não está determinado, como se processa a informação entre receptor e ligando, havendo várias hipóteses<sup>23</sup>.

Os receptores solúveis das citocinas competem com os receptores ligados a membrana regulando a sinalização das citocinas. Tais receptores solúveis podem ser receptores ligados a membrana, os quais são desprendidos intactos na circulação, ou como formas truncadas (por exemplo os receptores solúveis doTNF: Rs-TNF- $\alpha$ ), ou ainda como moléculas precursoras que são clivadas enzimaticamente (p. ex. IL-1R). Os receptores solúveis podem aparecer em resposta a um estímulo, como parte de um processo regulador independente, que ocorre naturalmente para limitar os efeitos deletérios dos mediadores (p.ex.: Rs-TNF- $\alpha$ ). Alguns receptores solúveis tem pouca atividade de ligação, representando perdas superficiais pouco relevantes dos receptores celulares (ex. forma solúvel da IL-2R $\alpha$ )<sup>24</sup>.

Em resumo, numerosos estímulos incluindo endotoxemia, o próprio TNF- $\alpha$ , como também outras citocinas, induzem a liberação de grandes quantidades de produtos dos receptores do TNF- $\alpha$  degradados por clivagem proteolítica dentro da circulação. A função

destes peptídeos chamados de proteínas ligadas ao TNF- $\alpha$ , ou receptores solúveis é incerta, mas parecem mediar a atividade biológica, controlando a dessensibilização aos ligandos, diminuindo a disponibilidade, diminuindo a sinalização e estimulando os mecanismos celulares que podem resultar, até mesmo, em falta de atividade e, parecem depender da quantidade presente na circulação. Baixos níveis dos receptores solúveis estão ligados a estabilização servindo como uma reserva disponível para liberação gradual. Altos níveis de receptores solúveis antagonizam os efeitos do TNF- $\alpha$  sinalizando citotoxicidade e outras respostas imunológicas<sup>12</sup>.

A utilidade potencial de tais receptores ou de seus inibidores na interrupção da cascata inflamatória está sob investigação. Numa tentativa de neutralizar a bioatividade do TNF, tem sido administrada proteína-1 ligada ao TNF recombinado humano (similar ao receptor solúvel-1 do TNF) para bloquear as modificações fisiopatológicas mediadas pelo TNF em coelhos durante bacteremia por *E. coli*. O tratamento com esta proteína melhorou as variáveis hemodinâmicas dos coelhos, suprimindo a atividade do TNF na circulação, como também a produção de TNF<sup>25</sup>.

Com relação ao papel do TNF- $\alpha$  e seus receptores na fisiopatologia da sepse ou choque séptico, ainda não há um consenso, havendo necessidade de estudos mais detalhados para definir sua importância como indicador prognóstico.

### **3. Disfunção cardíaca e modulação inflamatória na sepse**

O choque séptico em humanos geralmente produz um estado hiperdinâmico, com taquicardia, elevação do débito cardíaco e diminuição da resistência vascular sistêmica<sup>26</sup>. Após os primeiros dias da indução da hipotensão pela sepse, há depressão da fração de ejeção ventricular direita e esquerda, associada com dilatação ventricular. Tanto a diminuição da fração de ejeção como a dilatação ventricular se resolvem em um período de 10 a 14 dias nos pacientes que sobrevivem<sup>27</sup>.

No contexto da biologia molecular tem sido proposto que a depressão miocárdica presente no choque séptico seja dependente de uma substância circulante que diminui a contratilidade miocárdica (fator depressor do miocárdio - FDM ), substância esta que de acordo com modelos animais, parece ser uma citocina<sup>28</sup>.

Por exemplo, em estudos utilizando humanos saudáveis, a administração de endotoxina levou à depressão da função ventricular esquerda independente de alterações no volume ventricular ou na resistência vascular, sugerindo que a endotoxina seja um importante mediador da disfunção cardíaca direta na sepse<sup>28</sup>. Em outro estudo em humanos, a administração de endotoxina promoveu a produção de TNF- $\alpha$  e, a administração de ibuprofen (inibidor da ciclooxigenase - via tromboxane A<sub>2</sub>), antes e após o desafio com endotoxina, atenuou de modo significativo a resposta cardiovascular à administração de endotoxina. No entanto, a inibição da ciclooxigenase não previniu a elevação dos níveis de TNF- $\alpha$ , sugerindo que este efeito cardiovascular também seja produzido por outras vias além da ciclooxigenase<sup>30</sup>.

A depressão miocárdica que acompanha o choque séptico também pode ser responsável pelo aumento do óxido nítrico através da sintase do óxido nítrico induzida (iNOS) e da sintase do óxido nítrico constitutiva (cNOS). Há evidências que a expressão iNOS nos miócitos podem levar a depressão miocárdica em "ex vivo" fenômeno que pode ser revertido por inibidores da NOS e prevenido por glicocorticoides<sup>31</sup>.

#### **4. Disfunção vascular e mediadores biológicos na sepse**

A resistência vascular está diminuída no choque séptico, em contraste com outras formas de choque<sup>26</sup>. Esta diminuição na resistência vascular sistêmica leva a hipotensão, a qual pode ser refratária em infecções graves. A disfunção vasomotora periférica é um dos maiores determinantes da mortalidade, pois em não sobreviventes ela mantém-se persistentemente baixa. Tem sido proposto que a diminuição da resistência vascular

sistêmica encontrada na sepse seja causada pela liberação de autacóides vasodilatadores (prostaglandinas e prostaciclina) da membrana das células endoteliais<sup>3</sup>.

O endotélio funciona como uma barreira ativa que aumenta ou limita a entrada e saída vascular de substâncias secretadas ou metabolizadas por várias moléculas, as quais são ativas na regulação do tonus vascular, coagulação e permeabilidade. As células endoteliais tem seu papel na regulação do tônus vascular e fibrinólise através da secreção de vasoconstritores e vasodilatadores<sup>5</sup>.

A resposta inflamatória não controlada iniciada pelas citocinas e outros mediadores exerce seus efeitos finais ao nível de endotélio microvascular, o qual participa ativamente da patogênese da inflamação, funcionando como uma interface intermediária na sinalização dos neutrófilos circulantes. Neste sentido, o endotélio ativado de maneira moderada é benéfico, mas ativado em excesso pode levar a oclusão microvascular e disfunção<sup>22</sup>.

As células endoteliais quando ativadas por LPS ou por citocinas, adquirem função pró-coagulante e pró-trombótica pela liberação da tromboplastina, do inibidor-ativador do plasminogênio (PAI-1) e do fator ativador das plaquetas (PAF), e pela diminuição da trombosmodulina. Em sua superfície, as células expressam novas moléculas de adesão ou intensificam as moléculas normalmente presentes, as quais aumentam o recrutamento de monócitos, neutrófilos e células de adesão. Isto facilita a transmigração de leucócitos, mas também a destruição das células endoteliais<sup>5, 32</sup>.

As células endoteliais quando ativadas também produzem mediadores inflamatórios tais como interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), PAF e prostaciclina<sup>5</sup>. As prostaciclina são produzidas pelas células endoteliais. São poderosas vasodilatadoras e inibidoras da agregação plaquetária, sendo liberadas por perturbação mecânica ou química da membrana celular<sup>32</sup>.

Por outro lado, a mediação das anormalidades na contratilidade da vasculatura muscular lisa na sepse seria também dependente de uma molécula lábil liberada pelo endotélio vascular chamada fator relaxador do endotélio (EDFR), também conhecida como

óxido nítrico (NO ou EDRF-NO) e também pela endotelina-1 (ET-1). Estas duas substâncias podem contrabalançar os efeitos uma da outra: o EDRF-NO relaxa a musculatura lisa e inibe a agregação plaquetária, enquanto a ET-1 é um potente vasoconstritor<sup>33</sup>. Além disto, as citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 também liberadas na sepse e com efeito vascular agiriam por mecanismos tanto endotélio-dependente como endotélio-independente, alterando a contratilidade da vasculatura muscular lisa na sepse produzindo predominantemente vasodilatação<sup>34</sup>.

No choque séptico, tanto os efeitos do NO mediados pelo 3'-5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), assim como seus efeitos tóxicos na respiração mitocondrial e formação de radicais livres de oxigênio parecem ser importantes. Na fisiopatogenia da sepse há um aumento da produção do NO por várias células após a exposição à endotoxina e este aumento de produção de NO pode contribuir para a vasodilatação e reatividade anormais características da sepse. Em pacientes com sepse clínica parece haver uma produção basal e contínua de NO para regulação do tônus vascular pulmonar e sistêmico<sup>34</sup>.

Sugere-se que a resposta hemodinâmica inicial da sepse é de responsabilidade do cNOS, pois estudos em roedores injetados com LPS mostram que a queda inicial da pressão arterial e do índice cardíaco foram acompanhadas de acidose láctica significativa e aumento do nitrato plasmático, sendo que o uso de L-canavanina (inibidor seletivo da iNOS) não exerceu qualquer efeito na pressão arterial no estágio precoce da endotoxemia ou na ausência de exposição ao LPS, indicando falta de inibição por este agente<sup>35</sup>.

Em suma, o controle do tonus vasomotor pelas células endoteliais envolve o equilíbrio entre três produtos primários, que são as prostaglandinas, o óxido nítrico (NO) e as endotelinas. No caso da resposta inflamatória na sepse, não está claro se existe ou não um desequilíbrio entre a produção de NO, prostaglandinas e as endotelinas. De um lado, o NO e prostaglandinas contribuem para a vasodilatação maciça e colapso vasomotor vista nos estados hiperdinâmicos. De outro lado, as endotelinas são responsáveis pela

vasoconstrição e pela inibição do óxido nítrico na vigência de isquemia, podendo haver um predomínio na produção de endotelina, o que pode potencializar o dano endotelial, induzindo estase microvascular e trombose. Na sepse, este mecanismo ainda não está definido<sup>36</sup>.

#### **4.1 Endotelina**

Entre suas múltiplas funções biológicas, o endotélio sintetiza substâncias vasoconstritoras, conhecidas como fatores de contração do endotélio (EDCFs), que incluem as endotelinas, os fatores produzidos pela via da ciclooxigenase (tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandinas H<sub>2</sub> e anions superóxidos) e possivelmente a angiotensina II.

As endotelinas são peptídeos de 21 aminoácidos podendo ser produzidos por uma grande variedade de células vasculares e não vasculares, estando presentes no cérebro, rins, intestinos pulmões e adrenais. No homem existem três isoformas de endotelina : ET-1, ET-2 e ET-3. A ET-1 é o único membro da família produzida pelas células endoteliais, porém também é produzida pelas células musculares lisas vasculares, neurônios e astrócitos do sistema nervoso central, células endometriais, hepatócitos, células mesangiais do rim, células de Sartori e células epiteliais da mama. A ET-1 é considerada o mais importante vasoconstritor conhecido, além de exercer muitos outros efeitos biológicos<sup>37</sup>.

As células endoteliais sintetizam um precursor, a pré-pró-endotelina, que sofre clivagem proteolítica (endopeptidase) gerando uma forma intermediária inativa (pré-endotelina ou big-endotelina). Subsequentemente é gerado o peptídeo ativo da endotelina. Esta forma ativa atua, então, em receptores específicos das células musculares lisas e ativa canais de cálcio dependentes de voltagem. Os efeitos biológicos da endotelina são mediados pelos receptores específicos ET-A, ET-B ET-C. Os receptores ETA encontram-se predominantemente nas células musculares lisas e ligam-se preferencialmente à ET-1 sendo responsáveis pela vasoconstrição. Os receptores ETB também estão presentes nas células musculares lisas, contribuindo para a vasoconstrição, particularmente em baixas

concentrações de endotelina. Diferentemente dos receptores ETA, os receptores ETB podem ser utilizados por todas as três formas de endotelinas. A ativação destes receptores induz a liberação de óxido nítrico e prostaciclina, e explica a vasodilatação transitória causada pela aplicação intraluminal de endotelina. Ambos os receptores expressam-se em outros tecidos, incluindo pulmão, coração, rim cérebro e glândulas adrenais. O terceiro receptor (ETC), mais específico para ET<sub>3</sub> não foi identificado<sup>37, 38</sup>.

Vários fatores são capazes de estimular a liberação de ET-1, e incluem: o estresse da bainha da parede do vaso, hipóxia, endotoxina, TNF- $\alpha$ , interferon, adrenalina, angiotensina, trombina, plaquetas ativadas e alguns prostanóides. A liberação local de ET-1 deve ser esperada durante qualquer resposta inflamatória<sup>39</sup>. Isto sugere que ET-1 seja liberada para contrabalançar os efeitos vasodilatadores e modular o tonus vascular. Em contraste, os vasodilatadores como o óxido nítrico e prostaciclina inibem a produção de ET-1, através de um mecanismo comum envolvendo a produção de 3'-5'- monofosfato de guanosina. A ET-1 pode estimular a produção do hormônio natriurético atrial cardíaco, talvez como mecanismo compensatório de oposição a ação vasoconstritora da ET-1, fazendo com que haja maior retenção de líquido e adequando a pré-carga em uma fase inicial. No entanto, o hormônio natriurético atrial aumentado também inibe a produção basal de ET-1, uma vez que os efeitos da ativação crônica da endotelina se tomam excessivos e contribuem para a deterioração da função cardíaca<sup>37</sup>.

As endotelinas exercem grande variedade de efeitos biológicos em diferentes tecidos: 1) efeitos hemodinâmicos: vasodilatação e hipotensão inicial seguida de vasoconstrição potente e efeito pressor sustentado, inotropismo e cronotropismo miocárdicos positivos, vasoconstrição das artérias coronárias; 2) efeitos renais: aumento da resistência vascular renal, redução do fluxo plasmático renal, aumento da absorção de sódio devido a efeitos hemodinâmicos; 3) efeitos neuroendócrinos: aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas, renina, aldosterona e fator natriurético atrial, modulação da transmissão sináptica; 4) efeitos nas células musculares lisas causando contração das

células musculares lisas vasculares, sendo a contração das veias mais acentuada que a das artérias e contração da musculatura lisa não vascular; e 5) efeitos pró mitogênicos e na transcrição de genes<sup>38</sup>.

Normalmente os níveis circulantes de endotelina, bem como a produção de peptídeos em vasos sanguíneos isolados são relativamente baixos, sugerindo que em condições fisiológicas pouca endotelina seja produzida devido a ausência de estímulo e/ou presença de mecanismos inibitórios potentes. Sabe-se, também, que a maior parte da endotelina produzida é liberada albuminalmente, ou seja, diretamente nas células musculares lisas e não na luz dos vasos, atuando mais como agente parácrino (local) do que como hormônio endócrino (circulante). Entretanto, a importância da endotelina circulante não pode ser descartada e sugere que a endotelina tenha outras funções além do controle vasomotor<sup>38</sup>.

A despeito dos potenciais efeitos diretos e indiretos no tonus vasomotor há um inequívoco aumento da produção e liberação da ET-1 na sepse, mas o seu papel permanece pouco esclarecido. Como potente vasoconstritor há uma tentativa de especular que a ET-1 contribui para diminuir o fluxo sanguíneo regional a certos órgãos, tais como intestino, rim e pulmão durante a sepse estabelecida. Por exemplo, em um estudo em ratos em que a sepse foi induzida pela endotoxina, a administração de quatro doses de anti-ET1 causou redução significativa da creatinina plasmática, uréia e aumento do volume urinário, sugerindo importante papel na disfunção renal<sup>40</sup>.

No entanto, a utilização dos efeitos do antagonista de receptor não seletivo ETA/ETB em ratos com choque endotóxico sugere que a liberação endógena da ET-1 serve para manter a pressão de perfusão e subsequente perfusão orgânica no choque séptico, uma vez que o grau de hipotensão, hiporeatividade a noradrenalina, disfunção renal e acidose metabólica aumentaram com o uso do receptor antagonista não seletivo ETA/ATB<sup>41</sup>.

Em resumo, a síntese de endotelina pode, de um lado, representar um mecanismo de defesa contra a vasodilatação e hipotensão induzida pela sepse. Altas concentrações de

endotelina plasmática podem refletir a gravidade do choque hiperdinâmico e a necessidade de um vasoconstritor potente. De outro lado, altas concentrações de ET-1 podem trazer prejuízo à microcirculação com perpetuação do dano tecidual. De qualquer forma, os elevados níveis de ET-1 em modelos experimentais e de paciente criticamente enfermos com sepse, sugere que este pode ser um indicador de gravidade, sem no entanto haver consenso se há um mecanismo causal para tanto. Além disso, não há evidência válida que prove a conexão entre a liberação de ET-1 e o colapso cardiovascular da sepse em humanos <sup>42</sup>.

### **5. Indicadores prognósticos biológicos na sepse**

Há um grande interesse em medidas dos níveis circulantes de citocinas como indicadores de gravidade da resposta inflamatória. Medidas iniciais das citocinas tem sido geralmente difíceis de interpretar, talvez porque as citocinas tenham meia-vida curtas e estão primariamente nos tecidos e não na circulação. Além disso, níveis plasmáticos de receptores solúveis de citocinas ou dos antagonistas dos receptores também poderiam refletir a gravidade da resposta inflamatória. A identificação precoce deste perfil pode viabilizar estratégias terapêuticas e tal monitorização pode indicar as possibilidades de sucesso terapêutico através de medidas pouco invasivas <sup>43</sup>.

Alguns destes marcadores tem sido bastante estudados. Por exemplo, quando a IL-1 $\beta$  é detectada em estudos de pacientes com sepse, ela parece estar associada com a gravidade da sepse. No choque séptico ela se mantém elevada, no entanto, não há um consenso em relação à sua associação com mortalidade <sup>44, 45, 46</sup>.

Por outro lado, as concentrações de IL-6 parecem correlacionar-se mais com a gravidade e prognóstico da sepse em humanos, sendo que foram encontradas concentrações maiores de IL-6 em paciente com choque séptico, e ao mesmo tempo, houve correlação com a mortalidade, APACHE II e pico de TNF- $\alpha$  <sup>47</sup>.

Em outro estudo com 27 pacientes com sepse e choque séptico, a colheita de sangue foi realizada entre dez minutos e 12 horas (média de 5 horas) do diagnóstico e repetida a cada 2 horas, num total de três medidas sequenciais. A avaliação do TNF- $\alpha$  mostrou correlação entre os escores de gravidade da sepse e mortalidade<sup>48</sup>.

Por outro lado, em um estudo com 38 pacientes, os valores plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-6 coletados no momento da definição de choque séptico, e depois somente após 24 e 48 horas, falharam em mostrar diferenças significativas entre sobreviventes e não sobreviventes, porém tanto TNF- $\alpha$  como a IL-6 diminuíram no tempo avaliado, de maneira significativa. No entanto, os valores de lactato, avaliados em conjunto com TNF- $\alpha$  e IL-6, apresentaram diferenças significativas entre sobreviventes e não sobreviventes, sugerindo ser o lactato um melhor indicador prognóstico<sup>49</sup>.

Em outro estudo, com 74 pacientes, também foi detectado aumento do TNF- $\alpha$  nas dosagens das primeiras 24 horas em 25 de 27 pacientes que mantiveram TNF- $\alpha$  detectável em qualquer medida até 7 dias subsequentes. Em dois pacientes o TNF- $\alpha$  só foi detectado em 48 horas após a entrada no estudo. Os pacientes que tinham maior TNF- $\alpha$ , apresentaram maior incidência de Síndrome de Angústia Respiratória Aguda do Adulto (SARA) e maior mortalidade do que pacientes sem TNF- $\alpha$  detectável no plasma<sup>50</sup>. Por outro lado, outros estudos não mostraram correlação do TNF- $\alpha$  com mortalidade em pacientes com sepse, e o TNF- $\alpha$  foi detectado em apenas 16% dos pacientes com sepse presumida e em 100% naqueles com sepse definida há 24 horas. Dos controles normais 5% apresentaram TNF- $\alpha$  elevado, bem como 8% dos pacientes sem choque séptico<sup>51</sup>. Nestes estudos em que não foi detectado TNF- $\alpha$ , pode-se especular que a técnica de imunoabsorvência empregada fosse pouco sensível, ou que o diagnóstico de choque séptico não fosse adequado.

Em resumo, a tentativa de definir o valor prognóstico do TNF- $\alpha$  e outras citocinas em pacientes com choque séptico não apresentou, até o momento, consenso nos resultados, sugerindo, talvez, que o TNF- $\alpha$  não seja um indicador fiel para prognóstico<sup>49, 52</sup>. Por

outro lado, o conhecimento emergente sobre os receptores solúveis do TNF- $\alpha$  e um possível papel modulador destes sobre as ações TNF- $\alpha$  talvez contribua para um maior conhecimento nesta área.

Neste sentido, estudos pioneiros em pacientes sépticos, utilizando receptores solúveis do TNF- $\alpha$ , mostraram que as concentrações plasmáticas do receptor solúvel-1 do TNF- $\alpha$  foram maiores nos não sobreviventes do que nos sobreviventes, embora não tenha havido diferença significativa do receptor-2 solúvel do TNF- $\alpha$  entre sobreviventes e não sobreviventes. Houve também correlação entre as concentrações aumentadas dos receptores solúveis com pobre prognóstico e com creatinina sérica elevada, sugerindo que o aumento dos receptores solúveis em síndrome séptica resultassem da insuficiência renal complicando a sepse <sup>53</sup>.

Já em outro estudo, em pacientes criticamente enfermos com risco de desenvolverem disfunção orgânica múltipla, a dosagem plasmática do TNF- $\alpha$  e também dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$ , coletados a cada 24 horas durante 10 dias, foram significativamente aumentadas nos pacientes não sobreviventes com disfunção orgânica múltipla em relação aos sobreviventes <sup>54</sup>.

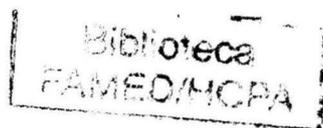
Em resumo, o significado da interação do TNF- $\alpha$  e seus receptores solúveis até hoje identificados na sepse ou choque séptico, ainda não atingiu um consenso, sendo necessários estudos mais detalhados para esclarecer aspectos relacionados à modulação dos efeitos biológicos e um eventual perfil prognóstico.

O curso natural das endotelinas na sepse clínica é desconhecido, mas o aumento das concentrações plasmáticas faz parte da sepse em humanos. Entretanto o significado fisiopatológico da endotelina na sepse não está esclarecido. Estudos em humanos mostram aumento do nível plasmático de ET-1 em pacientes com sepse e de sepse associada a SARA, sugerindo que a produção aumentada da ET-1 contribua para o aumento da resistência vascular, hipoperfusão e desenvolvimento de SARA <sup>55</sup>.

Em outro estudo de pacientes com sepse, o aumento das concentrações plasmáticas de ET-1 foi inversamente correlacionado com o índice cardíaco e positivamente relacionados com a gravidade da doença (APACHE II), sugerindo que o aumento da concentração de ET-1 com subsequente vasoconstrição e dano da perfusão tecidual seja um dos possíveis mecanismos de disfunção orgânica na sepse <sup>56</sup>.

Embora a ET-1 seja um importante regulador da resistência e distribuição do fluxo, não há dados suficientes para afirmar seu papel como indicador de gravidade da doença, ou seu papel na mortalidade. Somente trabalhos com intervenções específicas podem determinar se este mediador leva a uma má evolução, se tem efeito benéfico na hipotensão induzida pela sepse, ou se é apenas um fenômeno reativo.

## HIPÓTESE



No choque séptico há um aumento da produção de TNF- $\alpha$  e de seus receptores solúveis (Rs1-TNF- $\alpha$  e Rs2-TNF- $\alpha$ ), identificando um grupo de pacientes de maior risco de mortalidade. Um aumento da ET-1 acompanhando o aumento do TNF- $\alpha$  também configura um valor preditivo positivo para mortalidade em pacientes com choque séptico.

## OBJETIVOS

### **Geral:**

Caracterizar o perfil da resposta inflamatória sistêmica em pacientes com choque séptico através da medida sequencial de mediadores inflamatórios com efeitos hemodinâmicos opostos (TNF- $\alpha$  e seus receptores - vasodilatador predominante - e ET-1 - vasoconstritor predominante), buscando valores preditivos de mortalidade associados com estas medidas.

### **Específicos:**

1- Determinar os níveis plasmáticos do TNF- $\alpha$ , Rs1-TNF- $\alpha$ , Rs2-TNF- $\alpha$  e ET-1 de forma sequencial ao longo de 24 horas por ELISA (método imunoabsorvente), a partir da definição de choque séptico e monitorização hemodinâmica no CTI.

2- Determinar o valor preditivo do TNF- $\alpha$ , seus receptores e ET-1 em pacientes com choque séptico, sobreviventes e não sobreviventes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1- População em estudo

Foram estudados pacientes admitidos no Centro de Tratamento Intensivo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CTICC) com diagnóstico de choque séptico ou que desenvolveram choque séptico durante a hospitalização no período de 14 de março a 31 de agosto de 1996.

### 2- Delineamento do estudo

Estudo de coorte em que foi estudado o perfil sequencial de mediadores inflamatórios no plasma de pacientes com choque séptico tendo como desfecho a ocorrência de óbito.

### 3- Seleção da amostra

Os pacientes foram encaminhados ao CTICC pelos serviços de internação, sala de recuperação cirúrgica e emergência. Foram incluídos no protocolo de pesquisa aqueles que preenchiam os critérios de choque séptico e que tivessem assinado (ou responsável) o termo de consentimento pós-informação.

A definição utilizada de choque séptico foi a do American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine<sup>57</sup>, ou seja: sepse com hipotensão a despeito de adequada ressuscitação com volume, além de anormalidades de perfusão (acidose láctica, oligúria ou alteração aguda do estado mental). Os pacientes em uso de agentes inotrópicos e vasopressores poderiam não estar hipotensos no momento da avaliação hemodinâmica. Em todos os pacientes foi realizado o escore Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II) nas primeiras vinte e quatro horas como avaliação prognóstica e o número de

órgãos que apresentavam disfunção no momento da internação na CTICC, conforme critérios de Knaus<sup>58</sup>.

Todos os pacientes foram submetidos à cateterização urinária e monitorização hemodinâmica da artéria pulmonar, recebendo volume necessário para obtenção de pressão de enchimento atrial esquerdo ótima (o valor ótimo foi considerado pela curva do trabalho ventricular esquerdo versus pressão de oclusão da artéria pulmonar, no “platô” do valor do trabalho ventricular esquerdo). Também foram utilizadas drogas vasoativas para manutenção da pressão arterial média igual ou maior que 70mmHg, além de suporte nutricional, antibioticoterapia e cirurgia conforme tratamento padrão da CTICC HCPA, sem interferência dos pesquisadores.

Após a instalação do cateter em artéria pulmonar e reposição adequada de volume foram realizadas medidas hemodinâmicas e de transporte de oxigênio, utilizando monitores Hewllet Packard, modelo 66S. O momento zero foi definido como aquele das medidas iniciais pós monitorização hemodinâmica e definição diagnóstica. No entanto, foi anotado o tempo decorrido do diagnóstico de choque até o momento zero da coleta.

Foram excluídos da amostra os seguintes pacientes: a) os pacientes que não preencheram o diagnóstico de choque séptico; b) os menores de 16 anos; c) as pacientes gestantes; d) os portadores de insuficiência cardíaca; e) os pacientes com nefrotoxicidade induzida por ciclosporina; f) os portadores de insuficiência renal pós-isquêmica; g) os pacientes com vasoespasmos por hemorragia subaracnóide; h) os portadores de asma brônquica; i) os portadores de hipertensão pulmonar primária; j) os portadores de acidente vascular cerebral agudo; l) os pacientes com neoplasias; m) os pacientes com artrite incluindo artrite reumatóide; n) os pacientes com lupus eritematoso sistêmico; m) os pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida; n) os pacientes com lepra; o) os pacientes com leishmaniose; p) os pacientes com pneumoconiose e q) os pacientes com hepatite alcoólica.

Os mediadores biológicos foram analisados de maneira cega pelo pesquisador. Posteriormente, foram avaliadas as características hemodinâmicas, APACHE II e disfunção orgânica múltipla (DMOS) e os pacientes admitidos no estudo divididos em dois grupos: sobreviventes e não sobreviventes.

#### **4- Colheita de material**

**4.1 - Método de colheita** - Todas as amostras de sangue foram colhidas na via proximal do cateter colocado em artéria pulmonar, após posicionamento adequado monitorizado pelas curvas de pressão. Foram colhidas amostras no momento zero (admissão no estudo), seis, doze e vinte e quatro horas. Nos pacientes que não sobreviveram a coleta foi mantida até o óbito. Foram coletados dez (10) ml de sangue, por horário fracionados em três frascos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Logo após a coleta as amostras foram levadas ao laboratório de pesquisa do HCPA para centrifugação. O plasma obtido pela centrifugação das amostras foi separado em quatro tubos de ensaio ( cada tubo de ensaio continha aproximadamente 2,5 ml de plasma) e armazenado a -20° C para posterior análise conjunta.

Foram também coletadas amostras de dois voluntários saudáveis para o TNF- $\alpha$  e seus receptores e de dez voluntários saudáveis para a ET-1 com a finalidade de testar a adequação do método de dosagem dos marcadores por ensaio imunoabsorvente (ELISA), otimizar a curva padrão e obter parâmetros controles normais. As amostras de sangue dos voluntários saudáveis foram coletadas por punção de veia de antebraço e processadas da mesma forma que as demais amostras.

#### **4.2 - Método de dosagem plasmática dos marcadores**

A dosagem plasmática dos marcadores foi realizada por ELISA quantitativo em conjuntos comercializados para uso em pesquisa (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA).

## **5 - Análise estatística**

Os dados foram tabulados e analisados no programa Statistics Package for Social Science (SPSS). As variáveis contínuas estão apresentadas como médias e desvio padrão ou erro padrão, ou mediana pela assimetria dos dados. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para testes de dosagens repetidas comparando os níveis de mediadores nos horários sequenciais. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os dois grupos (sobreviventes e não sobreviventes), sendo considerado estatisticamente significativo um  $p < 0.05$ . As análises foram realizadas sem o conhecimento prévio dos dados clínicos. Foi calculado o risco relativo (RR), sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VP+) e valor preditivo negativo (VP-) em vários pontos de pontos em relação à mortalidade.

## **6- Considerações éticas**

O projeto de pesquisa foi aprovado pela comissão de ética e pesquisa do Grupo de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Não houve interferência no manejo dos pacientes com choque séptico, sendo seguidas as rotinas do CTICC. No entanto, foram coletadas amostras adicionais de sangue para as dosagens dos mediadores biológicos, caracterizando risco mínimo. Por esta razão, os pacientes ou responsáveis foram esclarecidos quanto ao propósito do estudo e assinaram consentimento informado previamente à inclusão no protocolo.

## RESULTADOS

### 1- Características clínicas da amostra

No período de 14 de março a 31 de agosto de 1996 foram incluídos no protocolo 23 pacientes, sendo posteriormente retirados da amostra dois pacientes, um por apresentar neoplasia associada e outro porque foi ao óbito logo após a coleta, sem completar as medidas hemodinâmicas. Dos 21 pacientes que foram estudados, houve 11 sobreviventes (52,4%) e 10 não sobreviventes (47,6%). Dezenove pacientes completaram a coleta de 24 horas, sendo que 1 paciente não completou 6 horas e o outro morreu em 18 horas.

O grupo de sobreviventes foi composto por nove mulheres e dois homens, com média de idade de  $43,7 \pm 12,8$  anos. O grupo dos não sobreviventes foi composto por sete homens e três mulheres com média de idade de  $64,5 \pm 16,6$  anos ( $p=0,004$ ).

As demais características da amostra são apresentadas nas tabelas 1 e 2.

#### 1.1 Comparação das características clínicas entre os grupos sobreviventes e não sobreviventes

O grupo dos sobreviventes apresentou maior número de mulheres e o grupo dos não sobreviventes maior número de homens, havendo diferença significativa na distribuição por sexo ( $p = 0,02$ ). Os sobreviventes apresentaram uma média menor de idade quando comparada aos não sobreviventes ( $p < 0,004$ ). Na distribuição do APACHE entre os dois grupos também houve diferença significativa ( $p = 0,0001$ ) entre sobreviventes (APACHE = 19,8) e não sobreviventes (APACHE = 17,1). A presença de DMOS entre os dois grupos ( $p = 0,02$ ), também foi significativamente diferente (sobreviventes = 2,7; não sobreviventes = 3,7).

Não houve diferença significativa entre sobreviventes e não sobreviventes em relação a média das horas em choque ao entrarem no estudo (19,8 x 15,4 horas, respectivamente com  $p = 0,52$ ).

**Tabela 1- Características clínicas da amostra : Sobreviventes**

Nº pac	sexo	idade	APACHE	Choque (horas)	DMOS	Causa do choque séptico
1	M	67	19	20	3	BCP
3	M	60	13	8	2	Suboclusão intestinal
4	F	62	19	19	3	Erisipela
7	F	43	18	44	5	Pneumonia
8	F	32	24	14	3	Pneumonia
9	F	37	15	23	2	BCP
13	F	38	14	20	2	Pneumonia
14	F	35	24	14	3	Tbc pulmonar
16	F	39	18	24	2	Obstrução Intestinal
17	F	33	16	12	3	Empiema
18	F	35	20	19	3	Pneumonia
<b>Média ±(dp)</b>		<b>43,7* ± (12,8)</b>	<b>18,2 * ± (3,7)</b>	<b>19,8 ± (9,3)</b>	<b>2,7 * ± (0,9)</b>	

\*p< 0,05 para média de idade, APACHE, e DMOS para o grupo de sobreviventes e não sobreviventes.

**Abreviaturas:** Nº pac - numeração do paciente na designação do estudo; Choque - número aproximado de horas com diagnóstico de choque; APACHE- Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; DMOS - Disfunção Múltipla de Órgãos e Sistemas; Média ± (dp) - média ± (desvio-padrão); Tbc pulmonar- tuberculose pulmonar; BCP- broncopneumonia.

**Tabela 2- Características clínicas da amostra: Não Sobreviventes**

Nº Pac	sexo	idade	APACHE	Choque (horas)	DMOS	Causa do choque séptico
2	M	74	26	2	3	Abcesso intraperitoneal
5	M	74	29	5	4	Úlcera perfurada
6	M	66	28	10	5	Pneumonia
10	F	78	33	10	2	Pneumonia
11	M	33	25	18	2	Pneumonia
12	F	77	25	24	3	Po sepse abdominal (úlceras perfuradas)
15	M	61	25	26	4	Po peritonite por úlcera perfurada
19	M	42	25	15	4	Pneumonia
20	M	84	39	22	4	Infecção em derivação fêmuro-poplíteica
21	F	56	24	22	2	Pneumonia
<b>Média</b>		<b>64.5*</b>	<b>27.7*</b>	<b>15,4</b>	<b>3.7*</b>	
<b>± (dp)</b>		<b>± (16,6)</b>	<b>± (4,9)</b>	<b>± (8,3)</b>	<b>± (0,9)</b>	

\*p< 0,05 para média de idade, APACHE, e DMOS para o grupo de sobreviventes e não sobreviventes.

**Abreviaturas:** Nº pac - numeração do paciente na designação do estudo; Choque (horas)- número aproximado de horas com diagnóstico de choque; APACHE - Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; DMOS - Disfunção Múltipla de Órgãos e Sistemas; Média ± (dp) - média ± (desvio-padrão).

## 1.2 Comparação das características hemodinâmicas e de transporte de oxigênio entre sobreviventes e não sobreviventes

Não houve diferença significativa entre as características hemodinâmicas e de transporte de oxigênio entre sobreviventes e não sobreviventes (tabelas 3 e 4).

**Tabela 3. Comparação das características hemodinâmicas e de transporte de oxigênio entre sobreviventes, no horário das 6 horas.**

<b>N pac</b>	<b>PAM*</b>	<b>PAOP</b>	<b>FC</b>	<b>IC</b>	<b>IRVP</b>	<b>IRVS</b>	<b>IDO2</b>	<b>IVO2</b>	<b>creat</b>
1	82	10	110	3,35	263	1719	496	141	0,9
3	85	7	97	2,9	457	2097	700	167	2,5
4	83	9	100	2,03	551	2994	429	90	1,4
7	78	21	107	2,7	318	1909	342	115	3,9
8	71	21	121	8,2	77	560	604	103	5,0**
9	80	17	78	5,26	289	1034	699	162	0,5
13	72	19	107	5,23	214	872	723	143	0,6
14	83	18	117	3,35	644	1669	413	99,2	0,6
16	75	20	115	4,68	137	1042	531	162	0,8
17	70	16	120	4,84	66	942	537	146	1,8
18	84	18	104	4,79	250	1218	601	112	0,6
<b>Média ± (dp)</b>	<b>78 ± (5,5)</b>	<b>4,3 ± (1,7)</b>	<b>106 ± (12,3)</b>	<b>4,3 ± (1,7)</b>	<b>297 ± (186)</b>	<b>1459± (701)</b>	<b>552 ± (126)</b>	<b>131 ± (27,9)</b>	<b>1,6 ± (1,5)</b>

**Abreviaturas:** n pac - numeração do paciente na designação do estudo; PAM\* - pressão arterial média em mmHg (todos os pacientes estavam em uso de drogas vasoativas); PAOP - pressão de oclusão da artéria pulmonar; FC - frequência cardíaca; IC - índice cardíaco em l/min/m<sup>2</sup>; IRVP - índice da resistência vascular pulmonar em dina.sec/m<sup>2</sup>; IRVS - índice da resistência vascular sistêmica em dina.sec/m<sup>2</sup>; IDO2 - índice da oferta de oxigênio em ml/min/m<sup>2</sup>; IVO2 - índice do consumo de oxigênio em ml/min/m<sup>2</sup>; \*\* paciente com insuficiência renal crônica.; creat - creatinina sérica em mg/ml.

**Tabela 4. Comparação das características hemodinâmicas e de transporte de oxigênio entre não sobreviventes, no horário das 6 horas.**

<b>N pac</b>	<b>PAM*</b>	<b>PAOP</b>	<b>FC</b>	<b>IC</b>	<b>IRVP</b>	<b>IRVS</b>	<b>IDO2</b>	<b>IVO2</b>	<b>creat</b>
<b>2</b>	59	26	158	2,99	722	883	356	151	0,8
<b>5</b>	58	8	110	2,76	260	1476	440	195	1,5
<b>6</b>	73	19	114	3,97	302	946	403	157	4,4
<b>10</b>	40	9	138	2,68	328	1044	329	122	1,5
<b>11</b>	68	15	133	3,23	545	1287	390	136	1,6
<b>12</b>	82	11	100	5,87	231	1008	822	178	2,0
<b>15</b>	71	15	102	4,3	443	813	722	130	0,6
<b>19</b>	103	24	140	6,02	106	1102	836	120	2,2
<b>20</b>	54	17	93	1,98	323	1574	321	152	2,3
<b>21**</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9
<b>Média ± (dp)</b>	<b>67 ± 18</b>	<b>16 ± (6,2)</b>	<b>121 ± (22,1)</b>	<b>3,7 ± (1,4)</b>	<b>362 ± (183)</b>	<b>1125± (264)</b>	<b>513 ± (215)</b>	<b>149 ± (25,3)</b>	<b>1,8 ± (1,08)</b>

**Abreviaturas:** n pac - numeração do paciente na designação do estudo; PAM\* - pressão arterial média em mmHg (todos os pacientes estavam em uso de drogas vasoativas); PAOP - pressão de oclusão da artéria pulmonar; FC - frequência cardíaca; IC - índice cardíaco em l/min/m<sup>2</sup>; IRVP - índice da resistência vascular pulmonar em dina.sec/m<sup>2</sup>; IRVS - índice da resistência vascular sistêmica em dina.sec/m<sup>2</sup>; IDO2 - índice da oferta de oxigênio em ml/min/m<sup>2</sup>; IVO2 - índice do consumo de oxigênio em ml/min/m<sup>2</sup>; Creat - creatinina sérica em mg/ml; \*\* medidas não realizadas por óbito do paciente.

## 2- Otimização metodológica do ensaio ELISA

Para otimização do método e das curvas padrão foram realizadas medidas de concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , Rs1-TNF- $\alpha$ , Rs2-TNF- $\alpha$  e ET-1 em amostras de sangue periférico em voluntários saudáveis, não fumantes e sem história de doença conhecida. As curvas e as amostras foram processadas em duplicata, sendo realizada uma curva padrão para cada placa utilizada de marcador biológico.

As concentrações de TNF- $\alpha$  encontradas em dois voluntários saudáveis foram de 5,06 pg/ml e de 6,5 pg/ml. Os valores normais de referência para este ensaio no plasma coletado com EDTA, para voluntários normais são menores que 15,6 pg/ml. Estes valores foram obtidos pelo fabricante através da avaliação da presença de TNF- $\alpha$  no plasma de 40 doadores aparentemente saudáveis. A sensibilidade do ensaio é de 4,4 pg/ml.

Os valores plasmáticos de Rs1-TNF- $\alpha$  para os voluntários normais no nosso estudo foi de 95,55 pg/ml e de 99,94 pg/ml. Os valores plasmáticos com EDTA, de referência para este ensaio em 40 voluntários normais, pelo fabricante, foi entre 484 a 1407 pg/ml, com uma média de 914 pg/ml, com sensibilidade de detecção mínima de 30 pg/ml.

Os valores plasmáticos de Rs2-TNF- $\alpha$  nos voluntários normais em nosso estudo foi de 176,063 pg/ml e de 157,714 pg/ml. Os valores obtidos pelo fabricante em 40 voluntários normais foram de 829 a 2262 pg/ml, com média de 1500 pg/ml em plasma com EDTA. A sensibilidade de detecção do Rs2-TNF- $\alpha$  foi menor que 10 pg/ml.

A média dos valores obtidos de ET-1 em dez voluntários normais foi de 2,5 ( $\pm$  2,9) pg/ml. Os valores obtidos pelo fabricante em 25 doadores aparentemente normais foram de 0,3 a 0,9 pg/ml, com uma média de 0,6 pg/ml. A sensibilidade deste ensaio é  $<$  0,25 pg/ml.

A tabela 5 mostra a comparação entre as médias dos voluntários normais da amostra, as médias dos sobreviventes e não sobreviventes.

**Tabela 5- Comparação das concentrações médias, em pg/ml, entre voluntários normais, sobreviventes e não sobreviventes para os diversos marcadores.**

	Sobreviventes	Não sobreviventes	p	Voluntários normais
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	11,965	36,716	0.001*	5,06 e 6,5
<b>Rs1- TNF-<math>\alpha</math></b>	594,768	760,188	0.001*	95,5 e 99,94
<b>Rs2- TNF-<math>\alpha</math></b>	975,534	1055,867	0.53	176,063 e 157,714
<b>ET-1</b>	29,211	39,7874	0.002**	2.5#

\* e \*\* - p estatisticamente significativo. # - média de ET-1 de 10 voluntários normais

### 3- Concentração plasmática sequencial de TNF- $\alpha$ nos sobreviventes e não sobreviventes

A dosagem sequencial de TNF- $\alpha$  nos momentos zero, 6, 12 e 24 horas demonstrou um aumento nos níveis plasmáticos nos sobreviventes e não sobreviventes em todas as medidas em relação aos níveis de voluntários saudáveis conforme dados do fabricante. Houve também um aumento significativo em todas as medidas dos não sobreviventes em relação aos sobreviventes. A evolução temporal é apresentada, em mediana, pela distribuição assimétrica na figura 3. As medianas são apresentadas na tabela 6.

**Tabela 6. Comparação da dosagem sequencial do TNF- $\alpha$ , entre sobreviventes e não sobreviventes (mediana).**

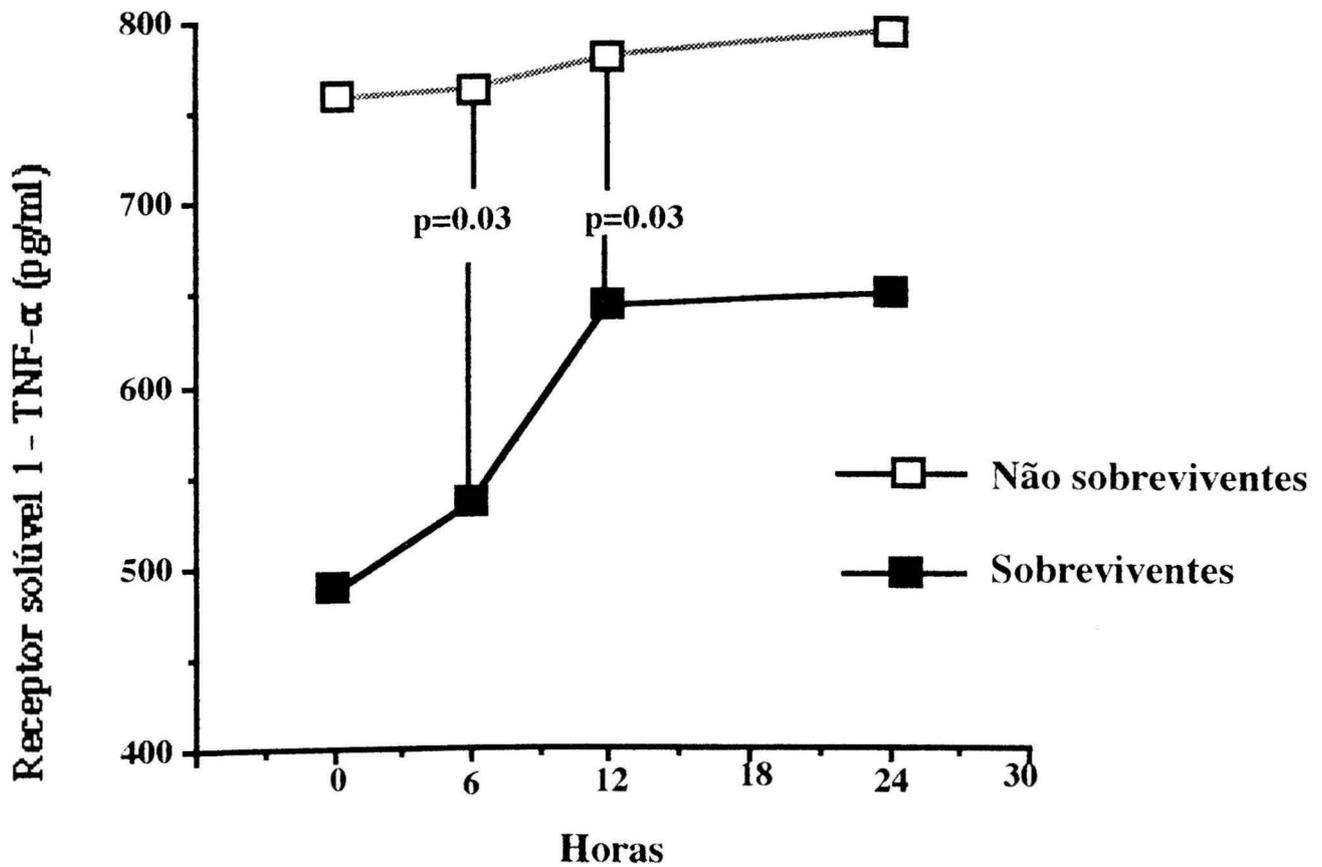
	<b>Hora 0</b> (pg/ml)	<b>Hora 6</b> (pg/ml)	<b>Hora 12</b> (pg/ml)	<b>Hora 24</b> (pg/ml)
<b>Sobreviventes</b>	<b>8,6</b>	<b>7,44</b>	<b>4,2</b>	<b>1,9</b>
<b>Não sobreviventes</b>	<b>27,6</b>	<b>21,17</b>	<b>26,87</b>	<b>19,8</b>

#### **4- Concentração plasmática de Rs1-TNF- $\alpha$ nos sobreviventes e não sobreviventes**

Os níveis plasmáticos em pg/ml do Rs1-TNF- $\alpha$  foram mais elevados nos não sobreviventes do que nos sobreviventes, sendo a diferença estatisticamente significativa no horário das 6 horas ( $p=0,03$ ) e 12 horas ( $p=0,03$ ). O comportamento do Rs1-TNF- $\alpha$  pode ser observado, em mediana, na figura 4. As medianas do Rs1-TNF- $\alpha$  são apresentadas na tabela 7.

**Tabela 7. Comparação da dosagem sequencial do Rs1-TNF- $\alpha$ , entre sobreviventes e não sobreviventes (mediana).**

	<b>Hora 0</b> <b>(pg/ml)</b>	<b>Hora 6</b> <b>(pg/ml)</b>	<b>Hora 12</b> <b>(pg/ml)</b>	<b>Hora 24</b> <b>(pg/ml)</b>
<b>Sobreviventes</b>	<b>487,07</b>	<b>535,32</b>	<b>643,30</b>	<b>648,77</b>
<b>Não sobreviventes</b>	<b>757,68</b>	<b>763,42</b>	<b>780,91</b>	<b>794,96</b>



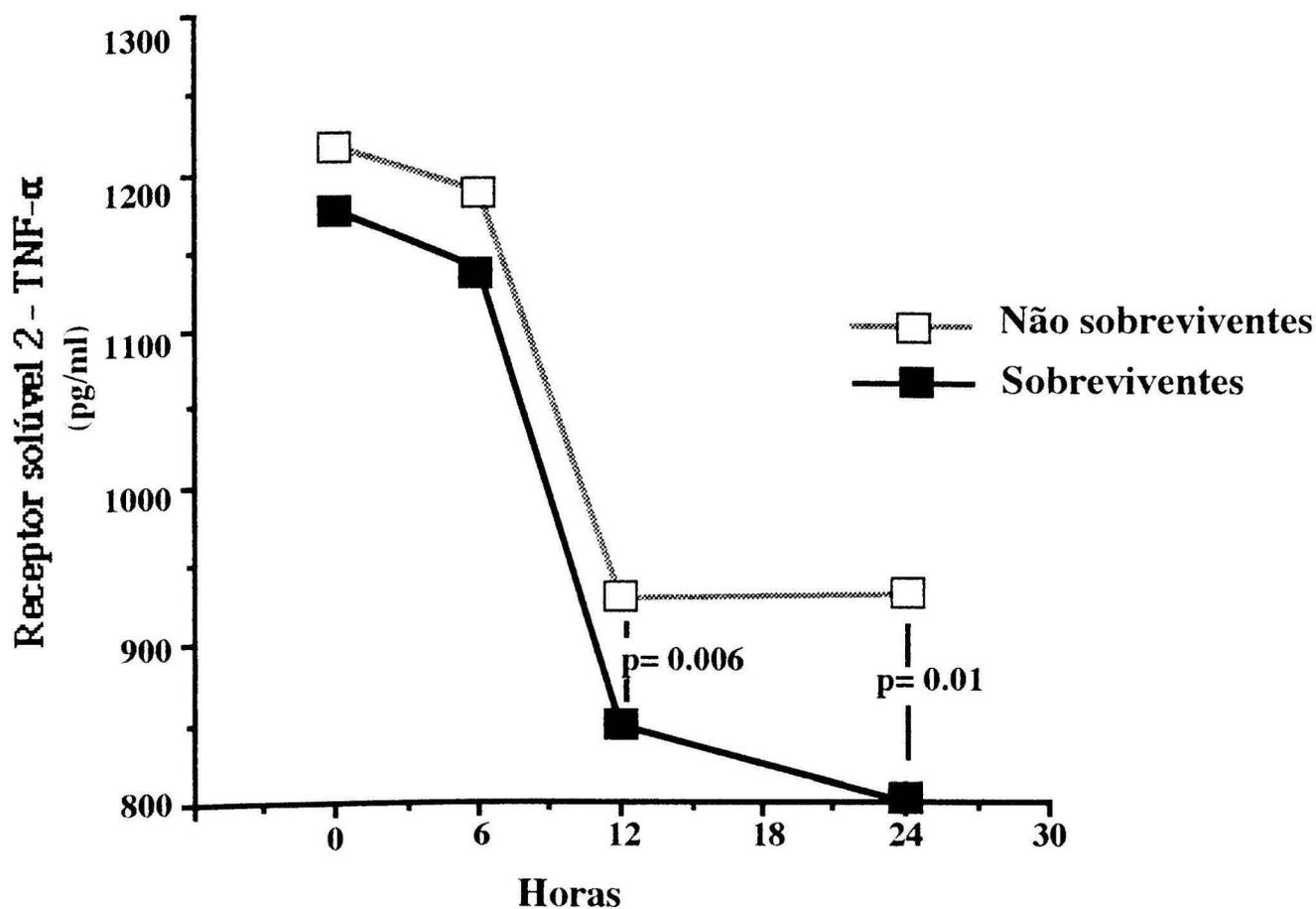
**Figura 4.** Valores plasmáticos da dosagem sequencial de Rs1-TNF- $\alpha$  em pacientes com choque séptico - sobreviventes e não sobreviventes. Houve aumento estisticamente significativo nas dosagens das 6 e 12 h no grupo dos pacientes não sobreviventes comparados aos pacientes sobreviventes

## 5- Concentração plasmática do Rs2-TNF- $\alpha$ nos sobreviventes e não sobreviventes

As concentrações plasmáticas sequenciais do Rs2-TNF- $\alpha$  nos pacientes não sobreviventes foram mais elevadas quando comparadas com os pacientes sobreviventes. No entanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os horários das 12 ( $p=0,006$ ) e das 24 horas ( $p=0,01$ ). A sequência temporal do Rs2-TNF- $\alpha$ , em mediana, é mostrada na figura 5. As medianas da dosagem sequencial do Rs2-TNF- $\alpha$  é mostrada na tabela 8.

**Tabela 8. Comparação da dosagem sequencial do Rs2-TNF- $\alpha$ , entre sobreviventes e não sobreviventes (mediana).**

	<b>Hora 0</b> (pg/ml)	<b>Hora 6</b> (pg/ml)	<b>Hora 12</b> (pg/ml)	<b>Hora 24</b> (pg/ml)
<b>Sobreviventes</b>	<b>1189,4</b>	<b>1149,86</b>	<b>850,22</b>	<b>800,58</b>
<b>Não sobreviventes</b>	<b>1231,29</b>	<b>1200,28</b>	<b>932,84</b>	<b>934,96</b>



**Figura 5.** Valores plasmáticos da dosagem sequencial do receptor solúvel 2 do TNF- $\alpha$  em pacientes com choque séptico - sobreviventes e não sobreviventes. Houve aumento significativo deste marcador nos horários das 12 e 24 horas no grupo dos não sobreviventes comparativamente ao grupo dos sobreviventes.

## 6- Concentração plasmática de ET-1 nos sobreviventes e não sobreviventes

As concentrações plasmáticas de ET-1 foram superiores em todos os pacientes da amostra em relação aos controles normais, sendo maior nos não sobreviventes.

As concentrações plasmáticas de ET-1 foram mais elevadas nos não sobreviventes do que nos sobreviventes, sendo a diferença estatisticamente significativa apenas no horário das 6 horas ( $p=0.02$ ). O comportamento temporal da ET-1, em mediana, pode ser observada na figura 6.

Os valores das medianas da ET-1 são mostradas na tabela 9.

**Tabela 9 . Comparação da dosagem sequencial de ET-1 entre sobreviventes e não sobreviventes (mediana).**

	<b>Hora 0</b> (pg/ml)	<b>Hora 6</b> (pg/ml)	<b>Hora 12</b> (pg/ml)	<b>Hora 24</b> (pg/ml)
<b>Sobreviventes</b>	<b>23,06)</b>	<b>22,53</b>	<b>29,19</b>	<b>25,69</b>
<b>Não sobreviventes</b>	<b>38,00</b>	<b>44,22</b>	<b>37,42</b>	<b>26,19</b>

### 7. Risco relativo (RR), sensibilidade (S), Valor preditivo positivo (VP+), especificidade (E) e valor preditivo negativo (VP-) das concentrações de TNF- $\alpha$ , Rs1-TNF- $\alpha$ , Rs2-TNF- $\alpha$ e ET-1

Foi inicialmente realizado o cálculo da chance (odds ratio - OR) de óbito pela concentração plasmática dos vários mediadores estudados em quartis, para verificar o ponto de corte de cada um deles. O ponto de corte ficou estabelecido entre os níveis 2 e 3 de cada mediador, no horário das 6 horas, em que houve diferença significativa entre sobreviventes e não sobreviventes em todos os mediadores, exceto para o Rs2-TNF- $\alpha$ , que não foi calculado por não haver diferença significativa entre sobreviventes e não sobreviventes (tabela 10), neste horário.

A chance de óbito (OR) para concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  menores que 15,5 pg/ml foi de 20% e para concentrações maiores que 15,5 pg/ml de 80%. A chance de óbito (OD) para concentrações plasmáticas de Rs1- TNF- $\alpha$  menores que 680,244 pg/ml de 30% e, para maiores de 680,244 pg/ml foi de 60%. A chance de morte (OR) para concentrações plasmáticas de ET-1 abaixo de 27,8 pg/ml foi de 22% e, para valores maiores de 27,8 pg/ml de 75%.

**Tabela 10. Comparação entre os pontos de corte, risco relativo, valores preditivos, sensibilidade e especificidade do TNF- $\alpha$ , Rs1-TNF- $\alpha$  e ET-1.**

	TNF- $\alpha$ (CI)	Rs1-TNF- $\alpha$ (CI)	ET-1(CI)
<b>PC (pg/ml)</b>	15,5	680,244	27,8
<b>RR</b>	3,5 (0,95-12,9)	2 (0,68-5,85)	3,4 (0,93-12,2)
<b>S (%)</b>	77,8	66,7	100
<b>VP + (%)</b>	70	60	72,7
<b>E (%)</b>	72,7	63,6	66,7
<b>VP - (%)</b>	80	70	100

**Abreviaturas:** PC - ponto de corte; RR - risco relativo; S - sensibilidade; VP + - valor preditivo positivo; E - especificidade; VP - valor preditivo negativo; (CI) intervalo de confiança.

Por se tratar de trabalho prospectivo foi calculado o risco relativo (RR) para cada mediador estudado, exceto Rs2- TNF- $\alpha$  que não apresentou diferença significativa no horário das 6 horas.

### **7.1 Valor preditivo, sensibilidade e especificidade do TNF- $\alpha$ ou ET-1**

De acordo com os dados obtidos neste estudo, se os valores da concentração plasmática de TNF- $\alpha$  forem maiores que 15,5 pg/ml e de ET-1 maiores que 27,8 pg/ml, o TNF- $\alpha$  e a ET-1 serão marcadores para óbito com:

$$S=100\% \quad VP+ = 72,7\% \quad E= 66,7\% \quad VP- = 100\%.$$

### **7.2 Valor preditivo, sensibilidade e especificidade do TNF- $\alpha$ ou Rs1-TNF $\alpha$**

De acordo com os dados obtidos neste estudo, se os valores da concentração plasmática do TNF- $\alpha$  forem maiores que 15,5 pg/ml e do Rs1-TNF- $\alpha$  forem maiores que 680.244 pg/ml, o TNF- $\alpha$  e o Rs1-TNF- $\alpha$  serão marcadores de óbito com :

$$S= 80\% \quad VP+ = 66,7\% \quad E= 63,6\% \quad VP- = 77,8\%.$$

### **7.3 Valor preditivo, sensibilidade e especificidade do Rs1-TNF- $\alpha$ ou ET-1**

De acordo com os dados obtidos neste estudo, se os valores das concentrações do Rs1-TNF- $\alpha$  maior que 680,2 ou ET-1 maior que 27,8 pg/ml, o Rs1-TNF- $\alpha$  e ET-1 serão marcadores de óbito com:

$$S= 90\% \quad VP+ = 69,2\% \quad E= 63,6\% \quad VP- = 87,5\%.$$

## DISCUSSÃO

A sepse e o choque séptico são causas importantes de morbimortalidade. Além disso a incidência da sepse continua a aumentar, e a mortalidade, a despeito do uso de modernos antibióticos e dos cuidados intensivos, permanece alta. Indicadores precoces de má evolução clínica podem ser úteis no manejo desta entidade.

Vários estudos tem documentado a presença ou elevação de citocinas ou inibidores de citocinas na circulação na sepse, tais como TNF- $\alpha$ , interleucinas, interferon e endotoxinas e ET-1 exercendo uma variedade de efeitos biológicos, inclusive até com efeitos opostos (vasodilatação e vasoconstrição). Além disso, na infecção grave há indução não somente de citocinas inflamatórias, mas também de seus antagonistas naturais, como os receptores solúveis. Têm sido feita associações positivas entre o nível plasmático de algumas citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6) e a mortalidade. Já com relação ao papel preditivo da endotelina há poucos dados disponíveis. Os receptores solúveis, particularmente aqueles relacionados com o TNF- $\alpha$  exibem níveis significativamente altos em infecção grave, no entanto, o exato papel desempenhado por estes receptores e seu potencial preditivo permanece pouco esclarecido.

Em nosso trabalho foi estudada, em pacientes com choque séptico, a concentração plasmática de marcadores biológicos (TNF- $\alpha$ , Rs1-TNF- $\alpha$ , Rs2-TNF- $\alpha$  e ET-1) sequencialmente a cada 6 horas até 24 horas após o início de monitorização hemodinâmica, com o objetivo de estabelecer precocemente o valor preditivo quanto a morbimortalidade destes marcadores. Os resultados obtidos confirmam o padrão característico do comportamento do TNF- $\alpha$  como indicativo de maior mortalidade, caracterizam com detalhe o comportamento dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$ , e de forma pioneira indicam que o aumento já nas 6 horas (correspondentes a 24 horas de evolução do choque séptico - tempo medido entre o diagnóstico e o momento 0) da ET-1 configura pior prognóstico, talvez com maior especificidade do que os outros indicadores estudados.

pontos medidos. As medidas plasmáticas do TNF- $\alpha$ , Rs1-TNF- $\alpha$  e ET-1 estudados mostraram diferença significativa entre os dois grupos a partir do segundo dia de choque séptico, ou seja, em torno de 24 horas do início da definição de choque séptico, se considerarmos a média de entrada no estudo de 18 horas, coincidindo com as medidas das 6 horas. Em virtude disto, esta medida foi utilizada para análise estatística dos parâmetros e citocinas estudadas.

O método ELISA tem permitido um considerável avanço no estudo de diversas doenças, uma vez que sua técnica apresenta relativa simplicidade e permite avaliação “*in vivo*” do comportamento de diversas substâncias. Particularmente, os ensaios da R & D Systems para dosagens de mediadores inflamatórios apresentam alta sensibilidade. Por exemplo, a sensibilidade para o TNF- $\alpha$  é de 4,4 pg/ml, para o Rs1-TNF- $\alpha$  é menor que 30 pg/ml e para o Rs2-TNF- $\alpha$  é menor que 10 pg/ml. Em outros estudos, utilizando outros métodos imunoabsorventes a sensibilidade para o TNF- $\alpha$  variou de 1 pg/ml até 39 pg/ml<sup>49, 51</sup>. Isto nos favorece pois trabalhamos com um método que nos permitiu detecções bastante sensíveis com estreita variabilidade. A especificidade do método é considerada muito boa, pois não apresenta reatividade cruzada com outros mediadores ou interferência significativa, tanto para o TNF- $\alpha$  como para os receptores solúveis do TNF- $\alpha$ .

A ET-1 apresenta uma sensibilidade neste ensaio da R & D Systems menor do que 1 pg/ml. Em relação à sua especificidade é observada reatividade cruzada relacionada com a “big-endotelina” < 1%, com a sarafoxina < 2%, com a ET-2 de 45% e com a ET-3 de 14%. No entanto, em outro estudo utilizando fabricante diferente a reatividade cruzada com ET-1 foi de 52% para ET-2, 96% para ET-3 e de 7% para “big-endotelina” com sensibilidade em torno de 2,5 pg/ml<sup>55</sup>. Portanto, neste estudo utilizamos metodologia com especificidade e sensibilidade maiores do que aquela dos escassos estudos anteriores no que diz respeito à sepsis.

As dosagens dos marcadores empregados no estudo e a utilização do método ELISA quantitativo exigiu que fosse feita uma adequação do método através da dosagem de

voluntários saudáveis. As qualidades das curvas padrão obtidas e os coeficientes de correção obtidos com equações polinomiais de terceiro grau utilizadas, atestam a adequação dos ensaios realizados. Além disso, as curvas e as amostras foram processadas em duplicata para diminuir a variabilidade do método.

### **Concentração plasmática do TNF- $\alpha$ e seus receptores**

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que exerce numerosos efeitos biológicos incluindo a caquexia em pacientes com cancer, disfunção cardíaca em inflamação sistêmica grave, e choque de diversas etiologias. Níveis séricos aumentados de TNF- $\alpha$  são encontrados nas doenças descritas acima, em pacientes com artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, síndrome da imunodeficiência adquirida, lepra e leishmaniose, pneumoconiose e hepatite alcoólica, entre outros<sup>33</sup>. Embora seja evidente que o TNF- $\alpha$  seja benéfico e indispensável durante circunstâncias fisiológicas e fisiopatológicas, é igualmente evidente que o TNF- $\alpha$  é um importante mediador do choque e da disfunção orgânica múltipla durante a sepse<sup>12</sup>. Também esta única citocina parece ser capaz de disparar o espectro completo de alterações fisiológicas, humorais e teciduais encontradas na síndrome do choque séptico. Este amplo espectro de ações pode modular efeitos benéficos ou não, dependendo da quantidade produzida, sua localização em tecido específico, a atividade local das proteínas ligadas ao TNF- $\alpha$  e do meio hormonal e de outras citocinas.

Estudos em animais após administração de endotoxina e TNF- $\alpha$  demonstram as mesmas alterações hemodinâmicas que a sepse em humanos, sugerindo que o TNF- $\alpha$  seja um dos mediadores que causam o choque séptico<sup>28, 29</sup>. Estudos realizados em humanos, nos quais foram medidas as concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  após a administração de endotoxina, mostraram aumento do TNF- $\alpha$  nos primeiros noventa minutos, concomitante com alterações hormonais e metabólicas, além do aumento da IL-1 $\beta$  e interferon- $\gamma$ . Por outro lado, o TNF- $\alpha$  também foi detectado em pacientes saudáveis, mostrando que o TNF- $\alpha$  pode estar presente no soro ou plasma de pessoas normais<sup>30</sup>.

Em nosso estudo houve aumento significativo deste marcador em todos os momentos da dosagem sequencial no grupo de não sobreviventes, comparado com o grupo de sobreviventes, confirmando outros estudos que apontam o TNF- $\alpha$  como um marcador de pior prognóstico. Houve uma diminuição progressiva do TNF- $\alpha$  a partir do momento zero da colheita até as 24 horas, sendo também este achado compatível com outros trabalhos descritos na literatura, apesar da definição de horários diferentes dos outros estudos<sup>49, 50, 52</sup>. No entanto, o protocolo por nós utilizado com início precoce das dosagens, assim como intervalos curtos de 6 horas, permitiu que se identificasse diferença estatisticamente significativa em todos os momentos, o que outros estudos não haviam demonstrado, talvez por utilizarem intervalos maiores, possivelmente pouco adequados no estudo de citocinas que apresentam meia vida sabidamente curtas.

Também no presente estudo a detecção de TNF- $\alpha$  acima de 15,5 pg/ml foi associado a uma probabilidade de óbito de 80% com um RR de 3,5 quando comparados com pacientes com TNF- $\alpha$  menor que 15,5 pg/ml. Este valor preditivo foi o do momento da hora 6, a qual foi significativamente diferente do ponto de vista estatístico entre sobreviventes e não sobreviventes. Os valores encontrados em voluntários normais foram de 5,06 pg/ml e de 6,5 pg/ml, mostrando, que no nosso estudo, os sobreviventes tinham, neste momento, uma média plasmática de TNF- $\alpha$  de 11,323 pg/ml e os não sobreviventes de 38,260 pg/ml, bem acima dos nossos controles normais.

Em relação ao Rs2-TNF- $\alpha$  houve um aumento significativo nas dosagens plasmáticas das 12 e 24 horas dos não sobreviventes comparadas com os sobreviventes, mas não foi possível uma associação com seu valor preditivo. Sabe-se que o Rs2-TNF- $\alpha$  também tem uma ação citotóxica sobre o segundo mensageiro e, talvez, apenas potencialize a ação do TNF- $\alpha$  através da geração de leucotrienos e prostaglandinas<sup>12</sup>. A expressão do Rs2-TNF- $\alpha$  em sua curva sequencial sugere que este sinaliza a partir do estímulo do TNF- $\alpha$ , acompanhando os níveis mais elevados deste nos não sobreviventes.

O Rs1-TNF- $\alpha$  mostrou um aumento significativo nas dosagens de 6 e 12 horas no grupo de pacientes não sobreviventes comparados ao sobreviventes. A curva do Rs1-TNF- $\alpha$ , no entanto, mostra uma elevação progressiva nos dois grupos, com formação de um "platô" entre 12 e 24 horas no grupo dos sobreviventes, sugerindo que o aumento nas primeiras horas possa sinalizar um efeito protetor do Rs1-TNF- $\alpha$ . Por outro lado, a maior concentração de Rs1-TNF- $\alpha$  na circulação dos não sobreviventes pode significar uma sinalização de citotoxicidade pela maior agressão inicial, secundária a uma produção mais elevada de TNF- $\alpha$  numa tentativa de antagonizar os efeitos do próprio TNF- $\alpha$  <sup>12</sup>.

Em nosso estudo o ponto de corte do Rs1-TNF- $\alpha$  foi de 680,244 pg/ml, com valor preditivo positivo de 60%, ou seja, esta é a probabilidade de morte neste ponto de corte, associada a um RR de 2. Encontramos uma sensibilidade de 66,7% e especificidade de 63,6%, menor que a sensibilidade e especificidade do TNF- $\alpha$  que foram de 77,8% e 72,7%, respectivamente. No entanto, a literatura sugere que o valor prognóstico dos receptores do TNF- $\alpha$  seja melhor que o próprio TNF- $\alpha$ , uma vez que o TNF- $\alpha$  é de difícil detecção e talvez seus receptores permaneçam mais tempo na circulação sendo mais fácil avaliá-los <sup>51</sup>. Em outro estudo o aumento dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$  foi associado a maior disfunção orgânica nos pacientes não sobreviventes do que nos sobreviventes, sugerindo que os receptores solúveis do TNF- $\alpha$  tivessem melhor valor preditivo do que o TNF- $\alpha$  <sup>54</sup>. No entanto, o valor preditivo para mortalidade destes receptores não foi investigado estatisticamente nos estudos acima mencionados, o que talvez explique em parte interpretações diversas sobre o papel deste marcadores.

### **Concentração plasmática de endotelina-1**

A ET-1 encontra-se aumentada no choque séptico, no choque cardiogênico, na insuficiência cardíaca, na nefrotoxicidade induzida por ciclosporina, na insuficiência renal pós-isquêmica, na hemorragia subaracnóide, na asma brônquica, na hipertensão pulmonar primária, na insuficiência cerebrovascular aguda, nas neoplasias, na artrite reumatóide, no

lupus eritematoso sistêmico, na síndrome da imunodeficiência adquirida, na lepra, na leishmaniose, na pneumoconiose, na hepatite alcoólica, na síndrome de Hellp e nas gestantes<sup>37, 38</sup>.

O curso natural das concentrações de ET-1 na sepse clínica é desconhecido. Acredita-se que na sepse em humanos o estímulo para liberação de endotoxina e TNF- $\alpha$  é contínua pela manutenção do foco infeccioso e poderia ser observado por vários dias, determinando um estímulo para a produção de endotelina. No entanto, o significado clínico patológico da endotelina na sepse não é claro, podendo refletir efeito protetor além da regulação do tonus vasomotor, modulando a liberação e atividade de outros agentes vasoativos tais como NO e eicosanoides das células endoteliais, via receptores ETB<sup>32, 39</sup>.

Na sepse a produção aumentada de ET-1 é secundária à endotoxina e ao TNF- $\alpha$  ativando os neutrófilos e as células endoteliais, os quais promoveriam a conversão da big-endotelina em endotelina. Em um trabalho em ratos para avaliar o efeito da reposição de volume, antibioticoterapia e antiendotoxina na mortalidade e nas concentrações sanguíneas de ET-1 e outros mediadores, em sepse intraabdominal induzida, foi demonstrado que a combinação de antibióticos e reposição de volume reduziu a mortalidade, mas não modificou as concentrações de ET-1. No entanto, a utilização de anticorpo anti-escherichia coli E5 reduziu a mortalidade e as concentrações de endotoxina, ET-1 e TNF- $\alpha$ , mas não da “big-endotelina”, sugerindo diminuição da síntese de ET-1 a partir da big-endotelina e preservação do clearance da ET-1 com a utilização dos anticorpos. Portanto o aumento da ET-1 durante a sepse pode ser secundária a produção da endotoxina e TNF- $\alpha$ <sup>62</sup>.

O aumento acentuado da endotelina no choque séptico e no choque cardiogênico pode implicar em um papel defensivo, ao invés de patológico. O aumento significativo da ET-1 plasmática associado a hipotensão sugere que esta seria necessária para manter a circulação periférica<sup>63</sup>. No entanto, os efeitos vasoconstritores da ET-1 se mantidos podem se tornar excessivos e contribuir para a deterioração da função cardíaca, uma vez que foi demonstrado em pacientes com sepse, que o aumento das concentrações

plasmáticas de ET-1 apresentou uma associação inversa com o índice cardíaco, sugerindo que a ET-1 seja um fator depressor do miocárdio na sepse <sup>42</sup>. Também existe contradição se a ET-1 é responsável ou não pela disfunção orgânica que acompanha a sepse e choque séptico, uma vez que os trabalhos na literatura são contraditórios, e relacionam o aumento da ET-1 a disfunção renal <sup>41, 55</sup>.

Em nosso trabalho observamos que as concentrações de ET-1 foram mais elevadas nos não sobreviventes do que nos sobreviventes, havendo diferença significativa no horário das 6 horas. No entanto, observamos na curva sequencial da ET-1 que os não sobreviventes aumentam os níveis plasmáticos nas primeiras horas e após apresentam um decréscimo progressivo do nível plasmático em 24 horas, chegando ao mesmo nível plasmático de ET-1 dos sobreviventes. Este comportamento não é descrito em nenhum trabalho prévio em choque séptico em humanos. É possível que esta resposta dos não sobreviventes seja um marcador da maior agressão do hospedeiro e sinalize um pior prognóstico ou evolução para DMOS, talvez com maior alteração da microcirculação. O fato de outros estudos não mostrarem esta curva se deve parcialmente as medidas não sequenciais utilizadas, e também o tempo de evolução do choque séptico. Em um dos estudos foi realizada apenas uma medida plasmática <sup>55</sup> e em outro, apesar de medidas sequenciais de seis em seis horas, não foi definido tempo de choque, exceto que os pacientes tinham 24 horas de hospitalização em CTI <sup>64</sup>.

Sabe-se pela literatura que a ET-1 é removida amplamente pela vasculatura pulmonar e, o restante, é eliminado pelo rim e leito esplâncnico <sup>39</sup>. No nosso estudo, em ambos os grupos de não sobreviventes e de sobreviventes a ET-1 estava aumentada, não havendo associação com a disfunção renal, avaliado pela creatinina plasmática. Também não houve diferença significativa na resistência vascular pulmonar ou resistência vascular sistêmica entre os dois grupos não se podendo discutir sobre seu efeito vasoconstritor em oposição à vasodilatação produzida pelo NO nestas circulações.

O ponto de corte para ET-1 foi de 27,8 pg/ml, sendo a probabilidade de óbito para valores acima do ponto de corte de 75% sendo associado a um RR de 3,4, similar ao do TNF- $\alpha$ . No entanto, a sensibilidade para ET-1 foi de 100% e o valor preditivo negativo de 100%, ou seja, a ET-1 é um marcador sensível, sem falso negativos para prognóstico. Estes valores foram bem acima daqueles encontrados em voluntários normais, cuja média foi de 2,5 ( $\pm$  2.9) pg/ml.

O nosso estudo não tem como objetivo definir o papel da ET-1 nos pacientes com choque séptico. Apenas podemos especular que o aumento da ET-1 nos sobreviventes parece ter apresentado um papel protetor, se opondo aos efeitos do TNF- $\alpha$  e demais mediadores vasodilatadores. Nos não sobreviventes, em que foi encontrada uma alta concentração de ET-1, podemos especular que ela provoque alteração endotelial e microvascular com dano isquêmico, e represente uma ligação importante entre o dano vascular e a ativação de leucócitos, levando a microtrombose por formação excessiva de produtos metabólicos como o tromboxane A<sub>2</sub>, perdendo seu papel protetor. Também podemos especular que este aumento observado da ET-1 nos não sobreviventes seja apenas uma maneira reativa exagerada a agressão inicial.

Por outro lado, é possível especular que o aumento da ET-1 nos não sobreviventes foi paralelo com o aumento do TNF- $\alpha$  numa tentativa de contrabalançar seus efeitos, sendo porém incapaz de anular as ações deletérias deste.

### **Valor preditivo, sensibilidade e especificidade do TNF- $\alpha$ ou ET-1, TNF- $\alpha$ ou Rs1-TNF- $\alpha$ e Rs1-TNF- $\alpha$ ou ET-1**

Quando avaliamos os valores preditivos dos vários marcadores associados, verificamos que o melhor desempenho se relacionou as concentrações plasmáticas do TNF- $\alpha$  ou ET-1. A presença destes marcadores em valores superiores a 15,5 pg/ml para o TNF- $\alpha$  e de 27,8 pg/ml para ET-1 foram marcadores de óbito com sensibilidade e VP - de 100%,

ou seja, sem falsos negativos, com uma especificidade de 66.7%. Os outros marcadores não mostraram um desempenho tão adequado.

### **Limitações do estudo**

A interpretação dos resultados obtidas neste estudo deve levar em consideração certas limitações metodológicas.

A ausência de maior número de indivíduos aparentemente saudáveis na comparação do TNF- $\alpha$  e seus receptores dificulta a avaliação dos resultados. Dessa maneira, para estes marcadores utilizamos como referência para normalidade aqueles valores fornecidos pelo fabricante a partir de dados obtidos em voluntários saudáveis. Idealmente, a utilização de controles históricos não é considerada metodologia adequada em pesquisa, principalmente tratando-se de indivíduos ditos como saudáveis, pois suas condições clínicas são essencialmente desconhecidas pelos investigadores.

O número de pacientes estudados, apesar dos resultados significativos é pequeno, dessa maneira não podemos avaliar se esta amostra é suficiente para validade externa.

### **Síntese**

Em resumo, neste estudo observamos que em pacientes com choque séptico o grupo de não sobreviventes apresenta uma concentração plasmática mais elevada dos mediadores estudados do que o grupo de sobreviventes. Foi possível caracterizar a resposta inflamatória e o comportamento dos mediadores precocemente estudados em um intervalo de 24 horas, correspondendo ao segundo dia de evolução do choque séptico. Além disto, ao utilizarmos um protocolo com dosagens plasmáticas precoces de seis em seis horas após monitorização hemodinâmica, foi possível definir, de maneira inédita, que altas concentrações de ET-1 apresentam valor preditivo para maior mortalidade similar aos achados do TNF- $\alpha$  (já mostrado na literatura), até talvez com maior sensibilidade do que este, não apresentando falsos negativos. No futuro, se métodos para mensuração de

endotelina plasmática forem disponíveis como instrumentos a beira do leito, pode-se especular que a identificação de pacientes com valores elevados, possa precocemente direcionar estratégias terapêuticas mais agressivas.

## CONCLUSÕES

- 1** - Os níveis plasmáticos encontrados de TNF- $\alpha$ , Rs1-TNF- $\alpha$ , Rs2-TNF- $\alpha$  e ET-1 encontram-se aumentados nos dois grupos de pacientes com choque séptico (sobreviventes e não sobreviventes) em relação aos valores de referência utilizados.
- 2** - Os níveis plasmáticos do TNF- $\alpha$ , Rs1-TNF- $\alpha$  e ET-1 dos pacientes não sobreviventes foram significativamente maiores do que os dos sobreviventes no momento das 6 horas.
- 3**- O Rs1-TNF- $\alpha$  apresentou valor preditivo positivo de 60% e especificidade de 63.6%.
- 4** - O valor preditivo do Rs2-TNF- $\alpha$  não foi definido, pois não apresentou diferença significativa entre o grupo de sobreviventes e não sobreviventes no momento das 6 horas.
- 5** - O TNF- $\alpha$  e a ET-1 apresentaram valor preditivo negativo de 80% e 100%, respectivamente, sugerindo que o aumento da concentração plasmática da ET-1 seja um marcador mais fiel, pois não apresenta falsos negativos.

## ESTUDOS COMPLEMENTARES

A análise crítica dos resultados obtidos neste estudo permite o levantamento de algumas questões que poderiam ser abordadas futuramente da seguinte forma :

- 1** - Estabelecer as concentrações plasmáticas em grupo de indivíduos normais para todos os mediadores estudados, estabelecendo desta maneira controles não históricos.
  
- 2** - Aumentar o número da amostra em trabalho longitudinal sequencial e estabelecer a evolução para disfunção orgânica múltipla e óbito para cada marcador.
  
- 3** - Desenvolver estudos experimentais em sepse para determinar a ação de cada marcador em órgão isolado, esclarecendo melhor o seu papel no choque séptico.
  
- 4** - Testar o uso de antagonistas aos mediadores biológicos no choque séptico para maior esclarecimento da fisiopatologia e estabelecimento de terapêutica apropriada.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Rangel-Frausto M, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis C, Wenzel R: The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Journal of American Medical Association* 1995;273:117-123
2. Knaus W, Wagner D, Harrell F: What determines prognosis in sepsis? *Update in Intensive Care and Emergency Medicine* 1995;19:141-156
3. Parrillo J, Parker M, Natanson C, Danner R, Cunnlon R: Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Annals of Internal Medicine* 1990;113:227-229
4. Williams J, Maier R: The inflammatory response. *Journal of Intensive Care Medicine* 1992;7:53-66
5. Lamy M, Deby-Dupont G: Is sepsis a mediator-inhibitor mismatch? *Intensive Care* 1995;21:S250-S257
6. Zivot J, Hoffmann W: Pathogenic effects of endotoxin. *New Horizons* 1995;3:267-275
7. Bone C: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Critical Care Medicine* 1996;24:1125-1128
8. Bone R: The systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Update in Intensive Care and Emergency Medicine* 1995;19:3-12
9. Downey G, Fialkow L, Fukushima T: Inicial interaction of leukocytes within the microvasculature: deformability, adhesion, and transmigration. *New Horizons* 1995;3:219-228
10. Gillan E, Plunkett M, Cairo M: Colony-stimulating factors in the modulation of sepsis. *New Horizons* 1993;1:96-109
11. Ganz T: Macrophage function. *New Horizons* 1993;1:23-27

12. Williams G, Giroir B: Regulation of cytokine gene expression: tumor necrosis factor, interleukin-1, and the emerging biology of cytokine receptors. *New Horizons* 1995;3:276-287
13. Arai K, Lee F, Miyajima A: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Review Biochemistry* 1990;59:783-836
14. Hauser C: Regional macrophage activation after injury and the compartmentalization of inflammation in trauma. *New Horizons* 1996;4:235-251
15. Blackwell T, Christman J: Sepsis and cytokines: current status. *British Journal of Anaesthesia* 1996;77:110-117
16. Dal Nogare A: Southwestern internal medicine: septic shock. *The American Journal of the Medical Sciences* 1991;302:50-65
17. Heard S, Fink M: The multiple organ failure syndrome. *Intensive Care Medicine* 1991;1515-1532
18. Cannon J, Tompkins R, Gelfand J, Michie H, Stanford G, van der Meer J, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B, Wilmore D, Wolff S, Burke J, Dinarello C: Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *Journal of Infectious Disease* 1990;160:79-84
19. Ikejima T, Okusawa S, Van der Meer J, Dinarello C: Induction by toxic-shock-syndrome toxin-1 of a circulating tumor necrosis factor-like substance in rabbits and of immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 from human mononuclear cells. *Journal of Infectious Disease* 1988;158:1017-1025
20. Tracey K, Cerami A: Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Critical Care Medicine* 1993;21:S415-S422
21. Beutler B, Grau G: Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Critical Care Medicine* 1993;21:S423-S435

22. Livingston D, Mosenthal A, Deitch E: Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinical-mechanistic overview. *New Horizons* 1995;3:
23. Bazzoni F, Beutler B: The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *The New England Journal of Medicine* 1996;334:1717-1725
24. Galley H, Webster N: The immuno-inflammatory cascade. *British Journal of Anaesthesia* 1996;77:11-16
25. Porat R, Paddock H, Schwaitzberg S, Connolly R, Wilkens T, Dasch J, Gascon M, Hutchison J, Ythier A, Wallach D, Dinarello C: Glycosylated recombinant human tumor necrosis factor binding protein-1 reduces mortality, shock, and production of tumor necrosis factor in rabbit *Escherichia coli* sepsis. *Critical Care Medicine* 1995;23:1080-1089
26. Parker M, Parrillo J: Septic Shock: hemodynamics and pathogenesis. *Journal of American Medical Association* 1983;250:3324-3327
27. Parker M, Suffredini A, Natanson C, Ognibene F, Shelhamer J, Parrillo J: Responses of left ventricular function in survivors and nonsurvivors of septic shock. *Journal of Critical Care* 1989;4:19-25
28. Natanson C, Eichenholz P, Danner R, Eichacker P, Hoffmann W, Banks S, MacVittie T, Parrillo J: Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *The Journal of Experimental Medicine* 1989;169:823-832
29. Natanson C, Fink M, HK B, MacVittie T, Conklin J, Parrillo J: Gram-negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. *Journal of Clinical Investigation* 1986;78:259-250
30. Michie H, Manogue K, Springs D, Revhaug A, O'dwyer S, Dinarello C, Cerami A, Wolff S, Wilmore D: Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *New England Journal of Medicine* 1988;318:1481-1486

31. Brady A, Poole-Wilson P, Harding S: Nitride oxide production within cardiac myocytes reduce their contractility in endotoxemia. *American Journal of Physiology* 1992;263:H1963-1966
32. Vane J, Anggard E, Botting R: Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England Journal of Medicine* 1990;323:27-36
33. Bone R: The pathogenesis of sepsis. *Annals of Internal Medicine* 1991;115:457-469
34. Lorente J, Landin L, Pablo R, Renes E, Liste D: L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Critical Care Medicine* 1993;21:1287-1295
35. Liaudet L, Feihl F, Rosselet A, Markert M, Hurni J, Perret C: Beneficial effects of L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, during rodent endotoxaemia. *Clinical Science* 1996;90:369-377
36. Maier R, Eileen M: Endothelial changes after shock and injury. *New Horizons* 1995;4:211-222
37. Levin R: Endothelins. *The New England Journal of Medicine* 1995;333:356-363
38. Batlouni M: Endotelinas e outros fatores vasoconstritores derivados do endotélio. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo* 1996;6:138-145
39. Curzen N, Jourdan K, Mitchell J: Endothelial modification of pulmonar vascular tone. *Intensive Care Medicine* 1996;22:596-607
40. Morise Z, Ueda M, Aiura K, Endo M, Kitajima M: Pathophysiologic role of endothelin-1 in renal function in rats with endotoxin shock. *Surgery* 1994;115:199-204
41. Ruetten H, Thiemermann C, Vane J: Effects of the endothelin receptor antagonist, SB 209670, on circulatory failure and organ injury in endotoxic shock in the anesthetized rat. *British Journal of Pharmacology* 1996;118:198-204

42. Pittet J, Morel D, Hemsén A, Gunning K, Lacroix J, Suter P, Lundberg J: Elevated of plasma levels of endothelin-like and concentrations are associated with the severity of illness in patients with sepsis. *Annals of Surgery* 1991;213:261-264
43. Waxman K: Shock: ischemia, reperfusion, and inflammation. *New Horizons* 1996;4:153-160
44. McAllister S, Bland L, Arduino M, Wenger P, Jarvis W: Patient cytokine response in transfusion-associated sepsis. *Infection and Immunity* 1994;62:2126-2128
45. Casey L, Balk R, Bone R: Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Annals of Internal Medicine* 1993;119:
46. Goldie A, Fearon K, Ross J, Barclay G, Jackson R, Grant I, Ramsay G, Blyth A, Howie J: Natural cytokine antagonist and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The sepsis intervention group. *Journal of the American Medical Association* 1995;274:172-177
47. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrinds Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M: Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Annals of Surgery* 1992;215:356-362
48. Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P: Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Critical Care Medicine* 1989;17:975-978
49. Marecaux G, Pinsky M, Dupont E, Kahn R, Vincent J: Blood lactate levels are better prognostic indicators than TNF and IL-6 levels in patients with septic shock. *Intensive Care Medicine* 1996;22:404-408
50. Marks J, Marks C, Luce J, Montgomery A, Turner J, Metz C, Murray J: Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. *American Review of Respiratory Disease* 1990;141:94-97

51. Groote M, Martin M, Densen P, Pfaller M, Wenzel R: Plasma tumor necrosis factor levels in patients with presumed sepsis. *Journal of American Medical Association* 1989;262:249-251
52. Calandra T, Baumgartner G, Wu M, Lambert P, Schellekens J, Verhoef J, Glauser M: Prognostic values of tumor necrosis factor/cachetin, interleukin-1, interferon-gama in patients with septic shock. *The Journal of Infectious Disease* 1990;161:982-987
53. Froon A, Bemelmans M, Greve J, van Linden C, Buurman W: Increased plasma concentrations of soluble tumor necrosis factor receptors in sepsis syndrome: correlation with plasma creatinine values. *Critical Care Medicine* 1994;22:803-809
54. Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau G, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter P: Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Critical Care Medicine* 1996;24:392-397
55. Sanai L, Haynes W, Mackenzie A, Grant I, Webb D: Endothelin production in sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Medicine* 1996;22:52-56
56. Weintzberg E, Lundberg J, Rudehill A: Elevated plasma levels of endothelin in patients with sepsis syndrome. *Circulatory Shock* 1991;33:222-227
57. Bone R, Balk R, Cerra F, Dellinger R, Fein A, Knaus W, Schein R, Sibbald W: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine* 1992;20:864-874
58. Knaus W, Draper E, Wagner D, Zimmerman J: Prognosis in acute organ failure. *Annals of Surgery* 1985;202:685-693
59. Hayes M, Timmins A, Yau E, Palazzo M, Hinds C, Watson D: Elevation of systemic oxygen delivery in the treatment of critically ill patients. *The New England Journal of Medicine* 1994;330:1717-1722
60. Tuchschtmidt J, Oblitas D, Fried C: Oxygen consumption in sepsis and septic shock. *Critical Care Medicine* 1991;19:664-670

61. Yu M, Levy M, Smith P, Takiguchi S, Miyasaki A, Myers S: Effect of maximizing oxygen delivery on morbidity and mortality rates in critically ill patients: a prospective, randomized, controlled study. *Critical Care Medicine* 1993;21:830-838
62. Lundblad R, Giercksky K-E: Effect of volume support, antibiotic therapy, and monoclonal antiendotoxin antibodies on mortality rate and blood concentrations of endothelin and others mediators in fulminant intraabdominal sepsis in rats. *Critical Care Medicine* 1995;23:1382-1390
63. Naruse M, Naruse K, Demura H: Recent advances in endothelin research on cardiovascular and endocrine systems. *Endocrinology Journal* 1994;41:491-507
64. Voerman H, Stehouwer C, van Kamp G, van Schijndel S, Groeneveld A, Thijs L: Plasma endothelin levels are increase during septic shock. *Critical Care Medicine* 1992;20:1097-1101