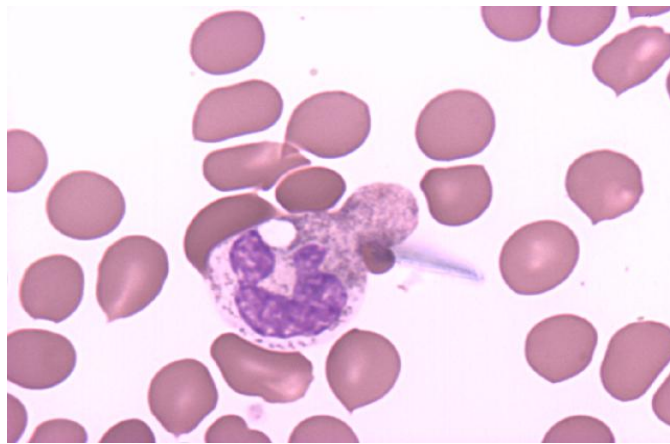


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

JOÃO RODRIGO CAMPOS

**MORFOMETRIA E CORRELAÇÃO CLÍNICO - LABORATORIAL DOS
VACÚOLOS EM NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM CHOQUE
HEMORRÁGICO**



BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

JOÃO RODRIGO CAMPOS

**MORFOMETRIA E CORRELAÇÃO CLÍNICO - LABORATORIAL DOS
VACÚOLOS EM NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM CHOQUE
HEMORRÁGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia – Área: Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Professor José Renan da Cunha
Melo

Coorientador: Professor Marcus Vinícius
Melo de Andrade

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

C198m Campos, João Rodrigo.
Morfometria e correlação clínico – laboratorial dos vacúolos em neutrófilos de pacientes com choque hemorrágico [manuscrito]. / João Rodrigo Campos. -- Belo Horizonte: 2015.
136f.: il.
Orientador: José Renan da Cunha Melo.
Coorientador: Marcus Vinícius Melo de Andrade.
Área de concentração: Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Inflamação. 2. Neutrófilos. 3. Vacúolos. 4. Choque Hemorrágico. 5. Apoptose. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Melo, José Renan da Cunha. II. Andrade, Marcus Vinícius, Melo de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM : QZ 150

VIA DA
SECRETARIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À
OFTALMOLOGIA

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

**MORFOMETRIA E CORRELAÇÃO CLÍNICO - LABORATORIAL DOS VACÚOLOS
EM NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES DE PACIENTES COM CHOQUE
HEMORRÁGICO**

JOÃO RODRIGO CAMPOS

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração RESPOSTA INFLAMATÓRIA À AGRESSÃO

Aprovada em 08 de julho de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Jose Renan da Cunha Melo - Orientador
Prof. Titular do Dpto. de Cirurgia FM-UFMG

Prof(a). Marcus Vinicius Melo de Andrade - Coorientador
Prof. Assoc. do Dpto. de Clínica Médica FM-UFMG

Prof(a). José Carlos Nogueira
Professor Aposentado do Dpto. de Morfologia ICB-UFMG

Prof(a). Soraya Rodrigues de Almeida Sanches
Profª. Assoc. do Dpto. de Cirurgia FM-UFMG

Belo Horizonte, 8 de julho de 2015.

Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina | UFMG
Av. Prof. Alfredo Balena, 150 - 5º andar
CEP. 30130-100 - Funcionários - BH/MG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À
OFTALMOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO JOÃO RODRIGO CAMPOS

Realizou-se, no dia 08 de julho de 2015, às 14:00 horas, sala 138, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *MORFOMETRIA E CORRELAÇÃO CLÍNICO - LABORATORIAL DOS VACÚOLOS EM NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES DE PACIENTES COM CHOQUE HEMORRÁGICO*, apresentada por JOÃO RODRIGO CAMPOS, número de registro 2013655481, graduado no curso de FARMACIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Jose Renan da Cunha Melo - Orientador (UFMG), Prof(a). Marcus Vinicius Melo de Andrade - Coorientador - (UFMG), Prof(a). José Carlos Nogueira (UFMG), Prof(a). Soraya Rodrigues de Almeida Sanches (UFMG). Suplente: Magda Maria Profeta da Luz (UFMG)

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 08 de julho de 2015.

Prof. Jose Renan da Cunha Melo – Prof. Titular do Dpto. de Cirurgia FM-UFMG

Prof. Marcus Vinicius Melo de Andrade – Prof. Assoc. do Dpto. de Clínica Médica FM-UFMG

Prof. José Carlos Nogueira – Professor Aposentado do Dpto. de Morfologia ICB-UFMG

Profa. Soraya Rodrigues de Almeida Sanches – Profa. Assoc. do Dpto. de Cirurgia FM-UFMG

Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina / UFMG
Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - 5º andar
CEP: 30140-100 - Funcionários - BH/IMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Jaime Arturo Ramírez

PRÓ-REITOR: Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG

DIRETOR: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À
OFTALMOLOGIA

COORDENADOR: Prof. José Renan da Cunha Melo

SUBCOORDENADOR: Profa. Ivana Duval Araújo

COLEGIADO:

1.Profa. Ivana Duval Araújo

2.Prof. José Renan da Cunha Melo

3.Prof. Marcelo Dias Sanches

4.Prof. Márcio Bittar Nehemy

5.Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto

6.Profa. Marisa Isabel Toulson Davisson Correia

REPRESENTANTE DISCENTE: José Aloysio Mourão

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS - BRASIL

2015

DEDICATÓRIAS

Dedico esta dissertação...

Aos meus pais, a minha noiva e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Dr. João Batista, pelo companheirismo e ensinamentos no Hospital Risoleta Tolentino Neves e por acreditar em minha capacidade na realização desta dissertação.

Sou profundamente grato ao Professor José Renan da Cunha Melo, pelos ensinamentos clínicos, científicos bem como a orientação.

Ao professor Marcus Vinícius, por me acolher e sempre me incentivar na realização desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Ailton e Maria Tereza, por acreditar no poder transformador da educação.

A minha noiva Cristiane, pelo apoio fundamental para a finalização deste trabalho.

Aos meus irmãos Simone e Ailton, pela amizade e companheirismo.

Ao professor Dr. Alan Lane de Melo, pelo incentivo a minha carreira científica no Laboratório de Biologia e Taxonomia de Invertebrados.

Ao Hyllo Baeta, pela minha iniciação na carreira de Análises Clínicas no Laboratório Geraldo Lustosa.

Ao Fernando Basques, pelos vastos ensinamentos no Hospital Risoleta Tolentino Neves.

Ao Fernando Antônio Botoni, pelo incentivo de minhas pesquisas na área clínico – laboratorial.

A Dra. Eliane Lustosa, por fornecer os materiais necessários a esta pesquisa e pela confiança depositada em minha trajetória no Laboratório Geraldo Lustosa.

Ao Adriano Basques, pelo incentivo primordial para realização do referido trabalho.

A Dra. Luisane, pelo incentivo incondicional a minha carreira científica.

A Silvia Cangussu, parceira fundamental para realização das fotos, medições e análise dos vacúolos.

A Dra. Maria Rosa, por ceder o Microscópio para realização das fotografias no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos colegas de trabalho do Hospital Risoleta Tolentino Neves, pelo apoio fundamental na coleta das amostras e confecção das lâminas.

Aos funcionários da Maternidade Otaviano Neves, por me apoiarem no momento de realização das disciplinas do mestrado.

Aos colegas da Unidade Matriz do Laboratório Geraldo Lustosa, pelo apoio no momento de finalização do trabalho.

A Vanuza, pelo carinho demonstrado nos momentos mais difíceis.

Ao Guilherme Milanez, pelo apoio em todos os momentos de minha trajetória.

Ao Wellington Tadeu, amigo incondicional da vida acadêmica.

A Linea Dias, por sempre confiar em meu trabalho.

A Nicole, pela ajuda fundamental na formatação deste trabalho.

Ao Senhor Gerson e Dona Meire, meus sogros, pelo incentivo nos momentos finais.

Aos professores das disciplinas do mestrado, que contribuíram para meu crescimento nas disciplinas lecionadas.

Aos médicos do Centro de Terapia Intensiva e do bloco cirúrgico do Hospital Risoleta Tolentino Neves, pelo aprimoramento nas discussões clínicas e pelo incentivo na realização desta pesquisa.

A Tia Maria Ilsa, pela finalização na correção gramatical desta dissertação.

Por fim, aos pacientes selecionados para o estudo, que a partir de seu gesto, contribuíram para o vasto conhecimento que se inicia no estudo dos vacúolos dos neutrófilos, em pacientes vítimas de choque hemorrágico.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO	2
2 . JUSTIFICATIVA	12
3.OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivos Secundários.....	14
4 . MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Materiais.....	16
4.1.1 Equipamentos	16
4.1.2 Material para coleta das amostras	16
4.1.3 Material para confecção e coloração do esfregaço.....	16
4.1.4 Material para análise das imagens	17
4.2.1 Casuística.....	17
4.2.2 Critérios para inclusão no estudo	17
4.2.3 Critérios para inclusão no grupo controle	18
4.2.4 Critérios para exclusão do estudo.....	18
4.2.5 Coleta das amostras de sangue.....	18
4.2.6 Tempos pré-determinados para coleta das amostras.....	19
4.2.7 Obtenção dos dados clínicos e exames laboratoriais.....	20
4.2.8 Análise das amostras de sangue	20
4.2.9 Confecção do esfregaço sanguíneo e preservação das lâminas	20
4.2.10 Análise e fotomicrografia das lâminas	21
4.2.11 Contagem e medições dos vacúolos nos neutrófilos	21
4.3 Método estatístico	22
5. RESULTADOS	25

5.1 Caracterização da população estudada	25
5.1.1 Grupo Controle	25
5.1.2 Grupo Choque	26
5.2 Caracterização morfométrica dos vacúolos nos grupos controle e choque	26
5.3 Ilustrações dos vacúolos na população estudada	33
5.4 Variáveis clínicas	35
5.4.1 Comparação entre frequência cardíaca e o número e área dos vacúolos	35
5.4.2 Dose de Noradrenalina administrada em comparação ao número e área dos vacúolos em μ^2	37
5.4.3 Comparação entre o número e área dos vacúolos com a pressão arterial média.	38
5.5 Variáveis Laboratoriais	41
5.5.1 Comparação entre o pH arterial médio e o número e área dos vacúolos	41
5.5.2 Comparação entre o lactato em mmol/L com o número e a área dos vacúolos no citoplasma dos neutrófilos	43
5.5.3 Comparação entre a contagem global média de leucócitos por mm^3 e o número e área dos vacúolos no citoplasma dos neutrófilos no grupo choque.	45
5.5.4 Comparação entre o percentual de neutrófilos no grupo choque (n=20) e o número e área dos vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos	46
5.5.5 Comparação entre o número absoluto de neutrófilos segmentados com o número e a área dos vacúolos contido no citoplasma dos neutrófilos do grupo choque.	49
5.5.6 Comparação entre o número absoluto de neutrófilos e a área e número de vacúolos	50
5.5.7 Comparação entre a porcentagem de bastonetes e o número e área dos vacúolos no citoplasma dos neutrófilos do grupo choque	50
5.5.8 Porcentagem e número absoluto de neutrófilos com vacúolo	53
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	61
8. PERSPECTIVAS	64
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
10. ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do mecanismo proposto para o rolamento dos neutrófilos no endotélio vascular e posterior transmigração.	4
Figura 2– Via de sinalização da apoptose através das caspases.	7
Figura 3 - Via de sinalização da morte celular por necrose. Essa hipótese procura explicar a morte celular que tem como substrato a vacuolização de neutrófilos.	9
Figura 4 – Representação do processo de leitura das lâminas.....	21
Figura 5 – Parâmetros utilizados para calibração do software de medição da área .	22
Figura 6 - Exemplo de medição de vacúolo de neutrófilo.....	22
Figura 7 – Fotomicrografia de neutrófilo do grupo controle com ausência de vacúolo citoplasmático, de acordo com a metodologia utilizada. (Aumento de 1000 X).	33
Figura 8 – Fotomicrografia de neutrófilo com granulações tóxicas e presença de vacúolos proeminentes no citoplasma. (Aumento de 1000 X).....	33
Figura 9 – Fotomicrografia de neutrófilo de paciente do grupo choque com presença de dois vacúolos maiores no citoplasma (Aumento de 1000 X)	34
Figura 10 – Fotomicrografia de neutrófilo de paciente do grupo choque com grande vacúolo citoplasmático (Aumento de 1000 X)	34
Figura 11 – Frequência cardíaca média em bpm e número médio de vacúolos /neutrófilo dos pacientes do grupo choque. (n=20)	35
Figura 12 - Frequência cardíaca média e área média dos neutrófilos de pacientes com choque hemorrágico (n=20) nos diversos tempos de coleta	36
Figura 13 - Comparação entre a infusão média de noradrenalina em mg/h e o número de vacúolos	37
Figura 14 - Comparação entre a área média dos vacúolos em μ^2 por neutrófilo e a dose média de noradrenalina administrada no grupo choque (n=20)	38
Figura 15 - Comparação entre o número médio de vacúolos e a pressão arterial média em mmHg do grupo choque (n=20).....	39
Figura 16 - Comparação entre a pressão arterial média em mmHg e área dos vacúolos/neutrófilo no grupo choque (N=20).....	40
Figura 17–Comparação entre o pH arterial média e o número de vacúolos por neutrófilo no grupo choque (N=20).....	41
Figura 18– Comparação entre o pH arterial médio e área média dos vacúolos por neutrófilo no Grupo Choque (n = 20).....	42

Figura 19– Comparação entre o número de vacúolos e o lactato em mol/L dos pacientes do grupo Choque (n=20).....	43
Figura 20 – Comparação entre a área dos vacúolos citoplasmáticos de pacientes com choque hemorrágico e níveis plasmáticos de lactato (n=20).....	44
Figura 21 - Comparação entre a contagem global média de leucócitos e o número de vacúolos	45
Figura 22- Comparação entre a contagem global de leucócitos e a área de vacúolos no Grupo Choque (n=20).	46
Figura 23 - Comparação entre o percentual de neutrófilos segmentado em relação à área de vacúolos em μ^2 no grupo choque (n=20).....	47
Figura 24 – Comparação entre o percentual de neutrófilos segmentados em relação ao número de vacúolos no grupo choque (n=20).....	48
Figura 25 – Comparação entre o número absoluto médio de neutrófilos em mm^3 do Grupo Choque (n=20) e o número de vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos.....	49
Figura 26 – Comparação entre o número absoluto médio de neutrófilos no grupo choque (n=20) e a área média dos vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos em μ^2 por neutrófilo.	50
Figura 27- Comparação entre a porcentagem de bastonetes e o número de vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos nos pacientes do grupo choque (n=20).	51
Figura 28 - Comparação entre a porcentagem de bastonetes e a área dos vacúolos contidos no citoplasma dos pacientes do grupo choque (n=20).....	52

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Representação do número de vacúolos por neutrófilo contidos no citoplasma dos neutrófilos de pacientes vítimas de trauma leve (grupo controle).....	26
Tabela 2 – Número de vacúolos/neutrófilo contidos no citoplasma do grupo de pacientes com choque grave.....	27
Tabela 3 – Análise morfométrica da área em μ^2 dos vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos do grupo controle, representada como média \pm EPM.	27
Tabela 4 – Análise morfométrica da área dos vacúolos em μ^2 contidos no citoplasma dos neutrófilos do grupo choque, representada como média \pm EPM.	28
Tabela 5 - Representação do número de vacúolos contidos no núcleo do grupo controle, como média \pm Erro padrão da média (EPM).	28
Tabela 6 - Representação do número de vacúolos contidos no núcleo do grupo choque como média \pm Erro padrão da média (EPM)	29
Tabela 7 – Análise morfométrica da área dos vacúolos em μ^2 contidos no núcleo dos neutrófilos do grupo controle, representada como média \pm EPM.....	29
Tabela 8 - Análise morfométrica da área dos vacúolos em μ^2 contidos no núcleo dos neutrófilos do grupo choque, representada como média \pm EPM.....	30
Tabela 9 - Correlação de Spearman para comparação entre área e número de vacúolos com parâmetros clínicos e laboratoriais.	31
Tabela 10 - Análise de Regressão linear multivariada em relação à área de vacúolos no citoplasma.	32
Tabela 11 - Análise de Regressão linear multivariada em relação ao número de vacúolos no citoplasma.	32
Tabela 12 – Porcentagem média de neutrófilos com vacúolo e neutrófilos jovens e segmentados em cada tempo de coleta no grupo choque.....	53
Tabela 13 – Número absoluto de neutrófilos com vacúolos e número absoluto de neutrófilos jovens e segmentados no grupo choque.	54
Tabela 14 - Porcentagem de neutrófilos com vacúolo no grupo controle.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ^2	micrometros quadrados
bpm	batimentos por minuto
EDTA	Ácido etilenodiamotetracético
FC	Frequência cardíaca
g/L	gramas por litro
HURTN	Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
mg/h	miligramas por hora
mm	milímetro
mm^3	milímetros cúbicos
p/c	Relação paciente controle
PTB	Tempo de Protrombina
PTT	Tempo de tromboplastina parcial ativada
pH	Potencial hidrogeniônico
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
RNI	Relação Normalizada Internacional
RL	Ringer Lactato
SL	Solução fisiológica
TNF α	fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

RESUMO

Campos, JR *Morfometria e correlação clínico laboratorial dos vacúolos em neutrófilos de pacientes com choque hemorrágico* [dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; 2015.

INTRODUÇÃO: O trauma tecidual e as agressões decorrentes do insulto induzem a migração e ativação de neutrófilos por meio de mediadores específicos. Para que seja evitada resposta inflamatória sistêmica, é essencial o processo de apoptose dos neutrófilos. A formação de vacúolos em neutrófilos aparece como promissora no mecanismo de controle do processo inflamatório em pacientes vítimas de choque hemorrágico. **OBJETIVOS:** Avaliar o número e o tamanho dos vacúolos contidos no citoplasma e no núcleo de neutrófilos, em esfregaço de sangue periférico, corado pelo método May Grünwald-Giemsa, em pacientes vítimas de traumatismos com choque hemorrágico. **MÉTODOS:** Foram coletadas sete amostras de sangue de vinte pacientes vítimas de traumatismo e evoluindo com choque hemorrágico e de 20 pacientes com trauma que não evoluíram com choque hemorrágico. A primeira amostra foi obtida logo após a admissão do paciente ao hospital seguido por novas amostras coletadas às 6, 12, 18, 24, 48 e 72 horas, após a coleta da primeira amostra. Foram confeccionados esfregaços de sangue e realizado a morfometria de vacúolos de 100 neutrófilos coletados a cada tempo no grupo controle e no grupo choque. Os vacúolos do núcleo e do citoplasma foram contados e a sua área medida usando software específico. **Resultados:** Os pacientes do grupo controle e do grupo choque apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao número e à área de vacúolos no núcleo e no citoplasma. Após análise multivariada, os parâmetros ácido láctico e frequência cardíaca apresentaram melhor correlação com a variação do número ($r = 0,634$) e área dos vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos ($0,624$) com diferença significativa ($p < 0,05$). **Conclusões:** O processo fisiopatológico decorrente do choque hemorrágico induz a maior vacuolização dos neutrófilos em relação ao grupo controle. Dentre os parâmetros clínicos e laboratoriais avaliados, o ácido láctico e a frequência cardíaca apresentaram melhor correlação com a variação do número e da área dos vacúolos citoplasmáticos dos neutrófilos.

Palavras chave: Inflamação, neutrófilo, vacúolos, choque hemorrágico, apoptose

ABSTRACT

ABSTRACT

Campos, JR *Morphometric and clinical laboratory correlation in neutrophil vacuoles of patients with hemorrhagic shock* [dissertation]. Belo Horizonte: Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais; 2015.

INTRODUCTION: Tissue trauma induces migration and activation of neutrophils through specific mediators. The process of apoptosis of neutrophils is essential to avoid the consequences of a systemic inflammatory response commonly seen after trauma. The formation of vacuoles in neutrophils seems to be a mechanism capable to attenuate the inflammatory response in patients victims of traumatic hemorrhagic shock. The aim of this work was to evaluate the number and size of cytoplasmic and nuclear vacuoles of May Grünwald-Giemsa stained neutrophils in peripheral blood smear obtained from trauma patients with hemorrhagic shock. **METHODS:** Seven sequential blood samples were collected from 20 patients with hemorrhagic shock and from 20 patients with trauma without hemorrhagic shock. The first sample was obtained just after the patient admission to the hospital followed by new samples collected at 6, 12, 18, 24, 48 and 72 hours, after collection of the first sample. Then blood smears were prepared and held morphometry of vacuoles hundred neutrophil collected each time the control group and shock group. The vacuoles nucleus and cytoplasm were counted and their area was measured using specific software. **RESULTS:** The number and area of vacuoles in neutrophil cytoplasm and nucleus from control group patients showed significant differences ($p < 0.05$) when compared to the shock group ones. Lactic acid and heart rate parameters showed correlation with the number ($r = 0.634$) and the area ($r = 0.624$) of neutrophil cytoplasmic vacuoles as shown by multivariate analysis ($p < 0.05$) **CONCLUSION:** Hemorrhagic shock induces greater vacuolization of neutrophils when compared to control group patients with mild trauma. Among the clinical and laboratory parameters evaluated, lactic acid and heart rate showed correlation with the number and area of neutrophil cytoplasmic vacuoles.

KEY WORDS: Hemorrhagic shock, Inflammation, neutrophil, vacuoles, apoptosis

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

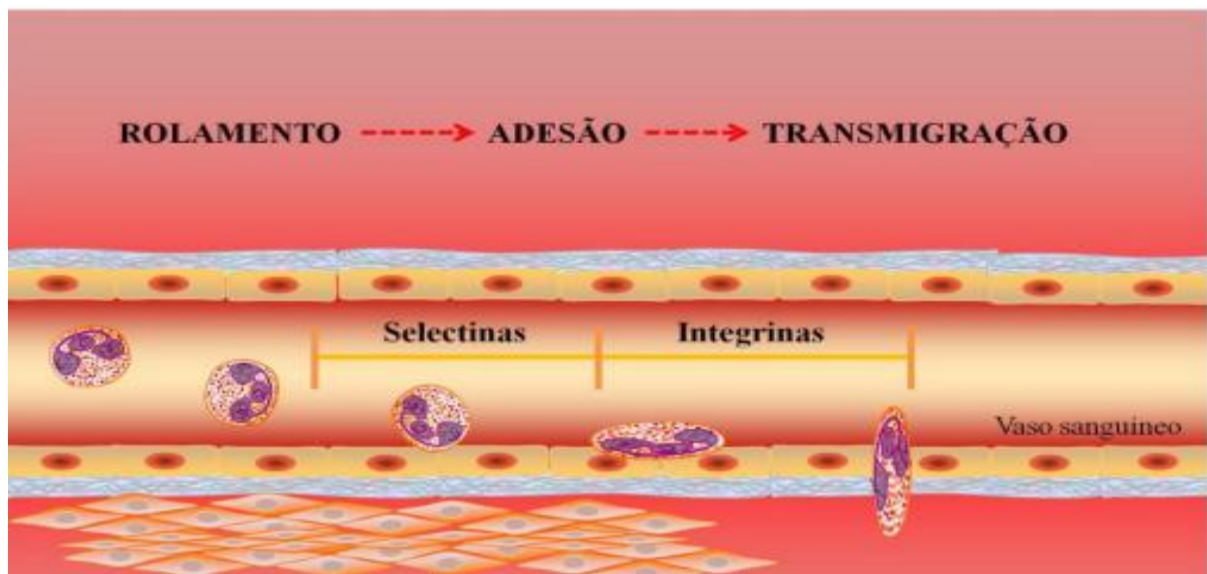
Choque pode ser conceituado como síndrome caracterizada pelo desequilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio aos tecidos, no qual a oferta torna-se insuficiente frente às necessidades metabólicas locais. O choque hemorrágico é tipo de choque hipovolêmico, no qual diminuição da volemia ocorre por perda sanguínea após o trauma. Hipovolemia refere-se à diminuição do volume sanguíneo decorrente da hemorragia, diminuindo a pressão de enchimento dos vasos e, conseqüentemente, diminuindo o retorno venoso. O débito cardíaco cai para nível abaixo do normal, e estado de choque se desenvolve. Os graus do estado de choque são conseqüentes à perda sanguínea, desde redução leve até completa cessação do débito cardíaco. (Guyton e Hall, 2006).

No choque hemorrágico ocorre, inicialmente, aumento de resistência vascular sistêmica, pelo aumento da atividade adrenérgica, como forma de manter o fluxo sanguíneo para órgãos vitais. Essas alterações hemodinâmicas conduzem a manifestações clínicas características do choque hemorrágico, tais como, hipotensão, taquicardia, palidez cutânea, sudorese e aumento do tempo de enchimento capilar (Rodgers, 1995). A resposta orgânica ao trauma é desencadeada por dois tipos diferentes de agressão (Rotstein, 2003): o primeiro atribuído à lesão tecidual direta como fraturas e cortes, com liberação local de mediadores inflamatórios. O segundo, causado pela perda sanguínea, com hipotensão e hipoperfusão tecidual, e pela hipóxia sistêmica em decorrência de lesão pulmonar, dificuldade respiratória por obstrução de vias aéreas e rebaixamento do nível de consciência. Outros fatores determinantes desse segundo tipo de agressão são acidose metabólica, lesão por isquemia-reperfusão e infecções próprias do período de ressuscitação (Rotstein, 2003).

O trauma tecidual e as agressões secundárias levam à liberação de mediadores inflamatórios locais e sistêmicos, que associados a fatores genéticos e individuais, levam às manifestações de síndrome de resposta inflamatória sistêmica - SRIS (Bone et al, 1992; Hensler et al, 2002). A resposta inflamatória decorrente do trauma é caracterizada pela produção de mediadores pró-inflamatórios tais como: fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 1 β (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator de migração de macrófagos (MMF), entre outras.

Essa resposta causada pelos mediadores é bem descrita na fase aguda do trauma e o aumento dos níveis séricos desses mediadores está relacionado à gravidade do trauma e à mortalidade (Donnelly et al, 1993; Donnelly et al, 1994; Martin, 1997). Estes mediadores pró-inflamatórios estimulam a produção e a ativação de neutrófilos que participam da reparação tecidual local com a liberação de radicais livres de oxigênio, através do burst oxidativo, e proteases (Botha et al, 1995). Ambos são inicialmente produzidos para reparar os tecidos lesados, porém atuam de forma fundamental na lesão por isquemia-reperfusão. O acúmulo e concentração tecidual destes leucócitos são um passo importante na resposta inflamatória inicial e ocorrem por ação de moléculas de adesão, que são ativadas tanto nos leucócitos quanto no endotélio por ação dos mediadores pró- inflamatórios. As moléculas de adesão descritas, as quais vão levar à adesão e à rolagem dos neutrófilos para os tecidos, são inicialmente as selectinas LAM-1 (leukocyte adhesion molecule), nos leucócitos, e ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule) e a selectina P no endotélio. No momento seguinte, outras moléculas denominadas integrinas são ativadas exercendo papel semelhante. As integrinas descritas são: ICAM-1 (intercellular adhesion molecules), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecules), CD11a/CD18, CD11b/CD18 e CD11c/CD18. O aumento dos níveis séricos dos receptores destas moléculas está relacionado à maior incidência de complicações pós-traumáticas (Botha et al, 1995; Fujishima e Aikawa, 1995, Keel, 2005). Em seguida, encontra-se a representação esquemática do processo de rolamento dos neutrófilos através do endotélio.

Figura 1 – Ilustração do mecanismo proposto para o rolamento dos neutrófilos no endotélio vascular e posterior transmigração.



Fonte: (Cook – Mills e Deem, 2005)

Durante a ativação e rolagem dos neutrófilos, inicia-se a produção de proteínas, entre as quais elastase e também de radicais livres de oxigênio, resultantes do processo de burst oxidativo. Estes produtos têm sua produção aumentada na fase de isquemia, associada à diminuição na produção de adenosina trifosfato – ATP celular, pela menor oferta tecidual de oxigênio. As bombas de Na^+/K^+ , altamente dependentes de ATP, funcionam de forma inadequada, permitindo a entrada de sódio nas células com consequente edema, associado ao aumento de cálcio intracelular (Robins, Stanley L., 2000).

Na fase de reperfusão, estes elementos interagem, incluindo os radicais livres de oxigênio, levando a fenômenos de peroxidação e de desintegração das membranas celulares, lesão do DNA e apoptose e necrose das células de defesa, endoteliais e nas parenquimatosas (Kong et al, 1998).

A morte celular dos neutrófilos seja por apoptose ou necrose é um importante mecanismo para controle do número destas células seja no indivíduo sadio ou no decorrente do choque hemorrágico decorrente do trauma.

Quando liberados da medula óssea, os neutrófilos permanecem por curto período de tempo na circulação (8-20 horas) e nos tecidos (1 a 4 dias). Diariamente são formados na circulação 0,8 a 1,6 x 10⁹ células / kg de peso corpóreo (Akgul et al., 2001; Maianski et al., 2004). Portanto, é necessário que o mesmo número de neutrófilos entre em apoptose (morte constitutiva) para manter a homeostasia.

Além disso, a morte dos neutrófilos é evento celular essencial para manter o número destas células durante os processos de infecção e inflamação, já que as enzimas e as espécies reativas de oxigênio secretadas pelos neutrófilos durante a infecção e inflamação podem ser tóxicas para células e tecidos próximos a este local, intensificando a inflamação. Deste modo, a apoptose dos neutrófilos senescentes e sua remoção por macrófagos permite a resolução rápida e eficaz do processo inflamatório (Luo e Loison, 2008).

A morte celular pode ocorrer por vários mecanismos: apoptose, necrose, necrose secundária, aponecrose, autofagia, oncose e senescência (Ryter et al., 2007). No entanto, apoptose e necrose são os tipos de morte celular melhor caracterizados. A distinção entre estes dois tipos de morte pode ser feita com base nas alterações morfológicas e bioquímicas (Wyllie et al., 1980).

O termo necrose, na etimologia grega, quer dizer “estado de morte”, e envolve um processo de morte que é resultado de lesão celular irreversível. Este tipo de morte celular geralmente acomete grupo de células vizinhas e envolve inflamação. Tumefação celular e degeneração gordurosa, com formação de vacúolos lipídicos no citoplasma são as primeiras alterações observadas. A mitocôndria e o retículo endoplasmático tornam-se tumefeitos. A ruptura dessas organelas confere o aspecto granuloso ao citoplasma observado nesses casos. A ruptura dos lisossomos causa lise das organelas, pelas enzimas lisossomais, e ocasiona a homogeneização do citoplasma, que toma o aspecto de massa acidófila e opaca. Quando toda basofilia é perdida e os limites entre as organelas se tornam indistinguíveis, as células necróticas são chamadas de *ghost cells*. A ruptura da membrana celular permite o extravasamento do conteúdo citoplasmático e a entrada de material extracelular. O rompimento celular induz resposta inflamatória local e fagocitose do tecido (Proskuryakov et al., 2003).

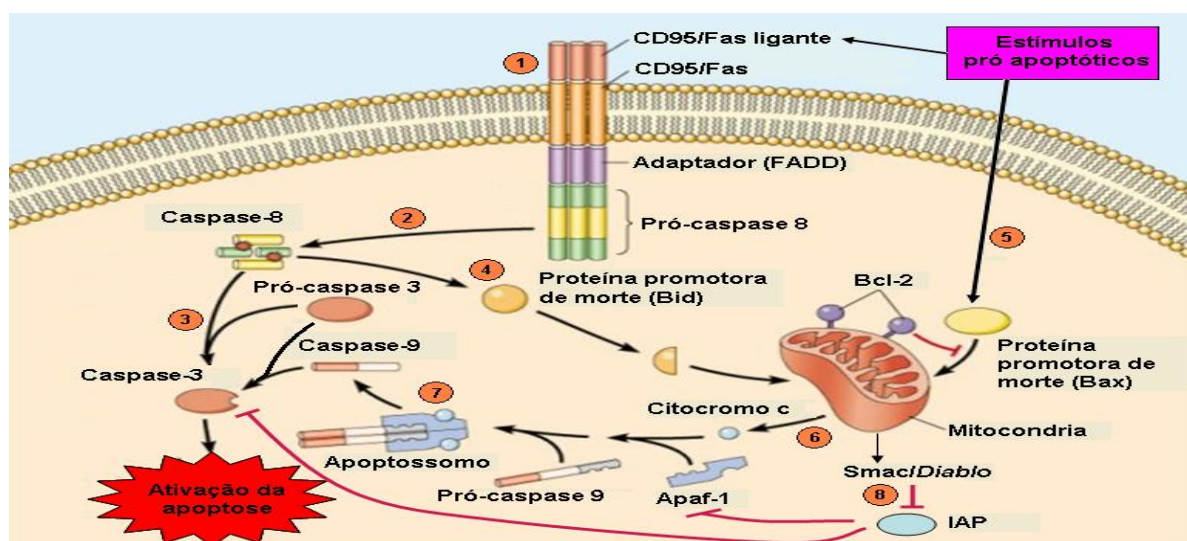
O termo apoptose, de etimologia grega, significa “folhas caindo das árvores” foi inicialmente descrita por Kerr et al. (1972). A apoptose é modelo bem

caracterizado de morte celular que pode ocorrer por uma diversidade de estímulos fisiológicos e não fisiológicos. Trata-se de um “suicídio celular” mediante a ativação de um processo bioquímico controlado, que requer energia e pode não envolver inflamação (Gorman et al., 1997). O processo apoptótico pode ocorrer em situações fisiológicas adaptativas como na embriogênese, ciclo menstrual, reabsorção de tecido mamário após desmame, menopausa, maturação do sistema nervoso central, morte das células imunes (linfócitos T e B no processo de seleção ou após depleção de citocinas), ou em situações patológicas como citotoxicidade de linfócitos T por aumento de ácidos graxos ou ceramidas, deleção de células em proliferação (criptas intestinais e tumores), infecções virais, estímulos nocivos e tratamentos drásticos (hipertermia, grandes variações de pH, radiação, agentes químicos) (Jacobson et al., 1997).

As células apoptóticas apresentam condensação de cromatina em grandes corpos granulares que se ligam à carioteca, e núcleo picnótico. Posteriormente, ocorre clivagem do DNA internucleossomal, em fragmentos de 180-200 pares de base ou maiores, pelas endonucleases. A fragmentação nuclear é uma fase irreversível da apoptose (Kerr et al., 1972; Thompson et al., 1998). Ocorre condensação do citoplasma, com grande aumento da densidade das organelas. Em seguida vacúolos citoplasmáticos são detectados e ocorrem projeções da membrana celular denominadas *blebs*. A seguir, essas *blebs* se destacam, dando origem aos corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos ou por células vizinhas (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980).

As caspases são responsáveis pela continuidade do sinal pró-apoptótico, fazem parte de uma família de cisteína proteases que clivam proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico (Kroemer, 1998), conforme observado na figura 2.

Figura 2– Via de sinalização da apoptose através das caspases.



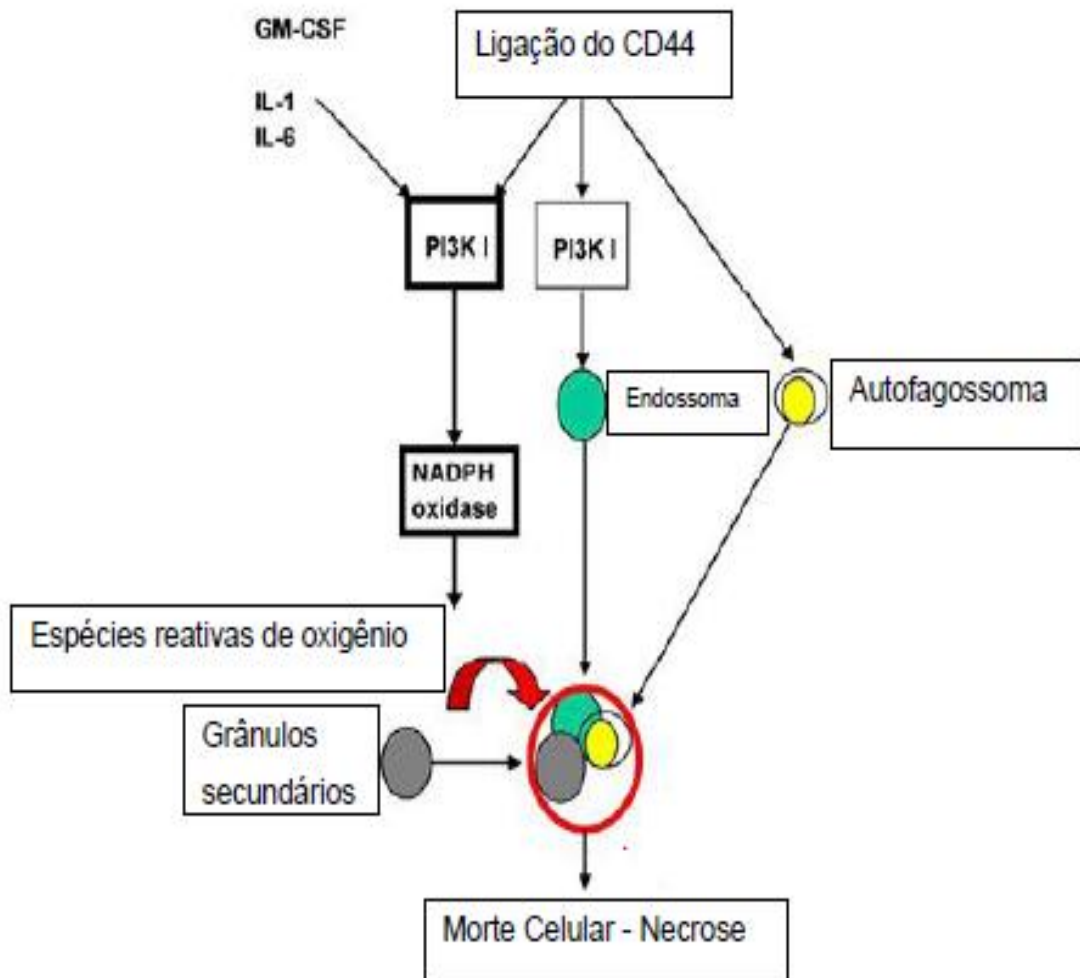
A apoptose desencadeada pela via extrínseca (1), também chamada de via receptor, envolve membros da superfamília de receptores de morte (CD95/Fas/Apo1 e TNF R1). Ligantes específicos sinalizam agregação e formação de um complexo indutor de morte que recruta pró-caspase (8 ou 10) através de proteínas de domínio de morte associadas ao receptor. O complexo formado pelo receptor, uma molécula adaptadora (FADD ou TRAAD) e pela pró-caspase é chamado de complexo DISC. O recrutamento da pró-caspase ao complexo DISC permite sua ativação. Uma vez ativada caspase 8 ou 10 (2), cliva a pró-caspase 3 tornando-a ativa (3) e pronta para clivar substratos específicos que induzem a apoptose celular. A via extrínseca pode interagir com a via intrínseca, potencializando o sinal apoptótico através da clivagem e ativação da proteína Bid (4), que facilita a ação da Bax e a formação do poro de transição mitocondrial. Já a apoptose desencadeada pela via intrínseca (5), também chamada de via mitocondrial envolve alterações sofridas na mitocôndria, geralmente ocorre em resposta a lesões de DNA e envolve a ativação de um membro pró apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Membros anti (Bcl-2, Bcl-xL) e pró-apoptóticos (Bax, Bid) da família Bcl-2 regulam a liberação do citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna (6). Este se associa com Apaf-1, dATP e pró-caspase 9, formando o apoptossomo (7), que torna a caspase 9 ativa. A caspase 9, por sua vez, cliva a caspase 3 e a torna ativa. Após dano mitocondrial, a *Smac/Diablo* é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo c (8). A *Smac/Diablo* bloqueia a função da IAP (proteína inibidora da apoptose), impedindo assim que esta iniba a atividade das caspases 9 e 3.

Fonte: <http://www.meduniwien.ac.at/pharmakologie/mitarbeiter/images/apoptosis.jpg> (modificado).

Estudo recente propôs mecanismo de morte celular de neutrófilos resultante de necrose programada (necroptose), (Mihalache *et al.*, 2011). Nela ocorreria estado inflamatório, mas sem o envolvimento de caspases. Esta morte celular está associada à fusão de organelas citoplasmáticas, que ocorre em neutrófilos expostos a GM-CSF e a outras citocinas inflamatórias e à ligação de CD44 (Mihalache *et al.*, 2011). Este tipo de morte de neutrófilos requer a ativação de PI3K, evento de sinalização normalmente associado às vias de sobrevivência das células. Nesse mecanismo de morte proposto, PI3K é necessário para a geração de

espécies reativas de oxigênio (ROS) o que provocaria a geração de vacúolos citoplasmáticos decorrente do processo de autofagia, pela fusão de endossomas, contendo CD44, com autofagossomas e grânulos secundários, mas não primários (Mihalache *et al.*, 2011). Os vacúolos nos neutrófilos nos pacientes com choque hemorrágico são o objetivo deste estudo.

Figura 3 - Via de sinalização da morte celular por necrose. Essa hipótese procura explicar a morte celular que tem como substrato a vacuolização de neutrófilos.



Fonte: Download from <http://www.jimmunol.org/> em 28 de março de 2014 (Mihalache *et al*,2011) (modificado)

Neutrófilos vacuolados também estão presentes em doenças infecciosas e na sepse em condições in vivo (Kroft, 2002). Observe-se Neutrófilos vacuolados também em pacientes com alcoolismo, em pacientes com a presença da Síndrome Jordan (Mitra *et al.*, 2010), em que os neutrófilos encontram-se permanentemente vacuolados e em pacientes com talassemia maior (Duru, Gumruk e Gurgey, 1994).

JUSTIFICATIVA

2 . JUSTIFICATIVA

Avaliar a possibilidade da criação de marcador de valor prognóstico rápido, relacionando número e tamanho dos vacúolos citoplasmáticos em neutrófilos de pacientes vítimas de choque hemorrágico, com os dados clínicos laboratoriais. O método é simples, rápido e de baixo custo, podendo ser implementado até mesmo em laboratório de análises clínicas de pequeno porte. O estudo dos vacúolos em neutrófilos de pacientes vítimas de choque hemorrágico é original e pioneiro conforme revisão da literatura na qual não foi possível encontrar nenhum trabalho similar.

OBJETIVOS

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o número e a área dos vacúolos contidos no citoplasma e no núcleo dos neutrófilos em esfregaço de sangue periférico, corado pelo método May Grünwald-Giemsa, em pacientes vítimas de traumatismos evoluindo com choque hemorrágico grave.

3.2 Objetivos Secundários

Correlacionar o número e a área dos vacúolos contidos no citoplasma e no núcleo dos neutrófilos de pacientes vítimas de choque hemorrágico, com a evolução clínica e laboratorial, avaliando os seguintes parâmetros:

- Pressão arterial média
- Dose de noradrenalina utilizada
- Frequência cardíaca
- Contagem global de leucócitos
- Porcentagem de neutrófilo segmentado
- Porcentagem de neutrófilos bastonetes
- Contagem absoluta de neutrófilos
- pH de sangue arterial
- Ácido láctico plasmático (Lactato)

MATERIAIS E MÉTODOS

4 . MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos

- Analisador Hematológico Sysmex 1800 Roche®
- Analisador Bioquímico Labmax 240 Labtest®
- Gasômetro ABL 825 Radiometer®
- Analisador coagulométrico Destiny Plus, Allere®
- Equipamento AVL 9180 Roche®
- Equipamento Bact Alert Biomerieux® para análise de hemoculturas.
- Microscópio ABX OLIMPUS® com câmera acoplada e software para processar imagens.

4.1.2 Material para coleta das amostras

- Tubo de citrato Becton Dickinson® (BD) de 3,5 ml para coleta dos parâmetros coagulométricos.
- Tubo de EDTA coleta do hemograma e confecção das lâminas (Becton Dickinson®)
- Tubo de Soro com ativador de coágulo de 4,5 mL para análise dos parâmetros bioquímicos e interleucinas (Becton Dickinson®)
- Seringa com heparina lítica balanceada para coleta da gasometria (Sarsted®)
- Tubos Ependorfs (Sarsted®) de 1 mL para congelamento do soro destinado a dosagem das Interleucinas.
- Seringa de 10 mL(Becton Dickinson®)
- Agulhas 25x7 mm e 25x8 mm (Becton Dickinson®).

4.1.3 Material para confecção e coloração do esfregaço

- Lâminas de vidro (Precision glass ®)
- Corante May Grunwald (Laborclin®)
- Corante Giemsa (Laborclin®)

- Lamínula 24 x 60 mm (Precision glass ®)
- Entellan solução 100 mL Merck ®
- Suporte metálico para coloração
- Porta lâminas

4.1.4 Material para análise das imagens

- Software Image J® versão 1.44

4.2 Métodos

4.2.1 Casuística

Foi realizada análise preliminar para determinação do tamanho da amostra do estudo. A mortalidade esperada para vítimas de traumatismos graves (ISS > 15) é de aproximadamente 10%. Utilizando um valor de alfa de 0,05 e de beta de 0,2 foi determinado que fosse necessário um total de 20 pacientes para o estudo. Foram estudados vinte (n=20) pacientes politraumatizados do sexo masculino, com idade entre 18 e 45 anos, atendidos no pronto socorro do Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves (HURTN) pela equipe da cirurgia de urgência. Baseado no mecanismo de trauma, os pacientes foram divididos em dois grupos: 1) grupo choque - 20 vítimas de traumatismo contuso ou penetrante que evoluíram com choque hemorrágico e 2) grupo controle - composto por 20 pacientes com trauma que evoluíram sem choque hemorrágico.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) do Hospital Risoleta Tolentino Neves, conforme termo em anexo (ANEXO A)

4.2.2 Critérios para inclusão no estudo

- Pacientes trazidos do local do trauma diretamente para o HURTN.
- Pacientes do sexo masculino com idade variando entre 18 e 45 anos, vítimas de traumatismos contusos ou penetrantes, com choque hemorrágico.

A presença de pelo menos um dos itens abaixo é necessária para definir choque hemorrágico no estudo:

- Pressão arterial sistólica < 90 mmHg e frequência cardíaca > 100 bpm não responsivos a reposição imediata de cristalóides (1000ml).
- Hemotórax maciço (\geq 1500ml) demonstrado por radiografia ou tomografia durante a avaliação inicial.
- Tamponamento cardíaco.
- Presença de sangue nas cavidades peritoneal ou retroperitoneal.
- Fraturas graves de pelve associadas ao choque hemorrágico.
- Necessidade de mais de 4 (quatro) litros de infusão de solução salina a 0,9% ou Ringer, para manter PA sistólica > 90 mmHg.
- Necessidade de transfusão de 4 (quatro) ou mais unidades de hemácias durante as 6 primeiras horas após o trauma.

4.2.3 Critérios para inclusão no grupo controle

- Traumatismos que não evoluíram com choque hemorrágico.

4.2.4 Critérios para exclusão do estudo.

- Presença de traumatismo crânio encefálico.
- Presença de doenças crônicas como diabetes, hipertensão, insuficiência renal ou hepática, doença pulmonar, doença cardiovascular.
- Presença de febre ou sinais de infecção nas primeiras 72 horas.
- Hemocultura positiva em qualquer das amostras colhidas até 72 horas.

4.2.5 Coleta das amostras de sangue

O processo inicial de coleta das amostras foi deflagrado a partir da solicitação do cirurgião de plantão na emergência do hospital, ou pelo anestesista responsável pelo paciente, nos casos em que este seja encaminhado diretamente para o bloco cirúrgico. Esse processo é feito rotineiramente no hospital. A partir desse momento os funcionários do laboratório de análises clínicas do HURTN

responsáveis pela coleta de material, enquadraram o paciente no estudo e a obtenção das amostras subsequentes, foram automaticamente submetidas aos seguintes passos: o bioquímico do plantão preencheu, em ficha específica, o horário da primeira coleta e o restante dos horários para as coletas subsequentes. A primeira retirada de sangue foi feita o mais próximo possível da admissão do paciente. Foram colhidos 10 ml de sangue por meio de punção venosa, de um dos membros, utilizando seringa de 10 ml (Becton Dickinson Ind. Cirúrgica Ltda. Curitiba, PR, Brasil), conforme rotina para pacientes politraumatizados graves. O sangue foi coletado em tubo de EDTA e encaminhado imediatamente ao laboratório de análises clínicas do HURTN para coloração pelo método May Grünwald-Giemsa de acordo com procedimento operacional padrão do Laboratório Geraldo Lustosa. Foram confeccionadas duas lâminas de cada tempo por paciente. O restante do sangue foi colocado nos tubos apropriados para os exames rotineiramente realizados na admissão de politraumatizados graves, entre eles: hemograma, coagulograma, glicemia, lactato, Proteína C Reativa, creatinina e uréia. Também, como realizado de rotina, foi puncionada uma artéria periférica para obtenção de amostra de sangue arterial para gasometria por meio de seringa de heparina lítica Sarsted® de 2 mL. O Soro foi obtido por meio da centrifugação de parte da amostra (3000 rpm por 10 minutos; a 2000 G) sendo armazenado em alíquotas de 200µl em eppendorfs e congeladas a -80°C. Estas serão utilizadas para dosagem de IL1, IL6, IL8, IL10, IL18 e TNFα.

Foram coletadas duas amostras para hemocultura, obtidas de acordo com os padrões determinados pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do HURTN, colhidas 72 horas após a obtenção da primeira amostra de sangue. A análise das mesmas seguiu a rotina do setor de bacteriologia do Laboratório Geraldo Lustosa. Os resultados foram arquivados em arquivo eletrônico do Sistema MV do Hospital e sistema Shift do Laboratório Geraldo Lustosa.

As amostras contidas nos eppendorfs e lâminas foram identificadas com o número de atendimento do paciente, tempo da coleta e iniciais do paciente.

4.2.6 Tempos pré-determinados para coleta das amostras

A primeira amostra, obtida o mais próximo possível do momento de admissão do paciente, foi denominada amostra “tempo um” (T1). A partir da amostra

T1 foram colhidas seqüencialmente mais seis amostras, a saber: seis horas (T6), 12 horas (T12), 18 horas (T18), 24 horas (T24), 48 horas (T48) e 72 horas (T72). Pacientes que não permanecerem no hospital, por qualquer motivo, até 72 horas após o trauma tiveram obtenção dos seus dados até o tempo máximo de permanência.

4.2.7 Obtenção dos dados clínicos e exames laboratoriais

O grupo de profissionais/pesquisadores envolvidos no projeto de pesquisa fizeram reuniões semanais para análise do preenchimento dos critérios de inclusão/exclusão dos pacientes no estudo. Após inclusão do paciente, foi preenchida ficha por um dos pesquisadores contendo dados de admissão, cirurgia realizada, lesões observadas e evolução diária do paciente. Os dados foram obtidos do sistema MV do HURTN. A revisão diária dos dados foi realizada por um dos pesquisadores principais. Os dados referentes aos exames laboratoriais foram obtidos através do Sistema Shift do Laboratório de Análises Clínicas.

4.2.8 Análise das amostras de sangue

- Creatinina – Reação de Jaffé com Ferrocianeto – Equipamento Labmax 240 - Labtest®
- Sódio, Potássio e Cloretos – Potenciometria/Eletrodo Seletivo – AVL 9180
- Proteína C Reativa – Turbidimetria – Labmax 240 - Labtest®
- Uréia – Urease - Labmax 240 - Labtest®
- Glicose - Oxidase/Peroxidase – Labmax 240 - Labtest®
- Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada - Coagulométrico – Equipamento DESTINY PLUS - Allere®
- Hemograma - Impedância/Citometria de Fluxo – Symex 1800 Roche®
- pH, pCO₂, pO₂ – Eletrodo Seletivo – Gasômetro ABL 825 - Radiometer®
- HCO₃⁻ e Excesso de base – calculado – Gasômetro ABL 825 - Radiometer®

4.2.9 Confecção do esfregaço sanguíneo e preservação das lâminas

O esfregaço sanguíneo foi realizado seguindo a técnica de May Grünwald - Giemsa (Woronzoff-Dashkoff, 2002) padronizada no Laboratório Geraldo Lustosa. Após colocar uma gota de sangue na lâmina, utilizou-se uma lâmina distensora com um ângulo de 25° a 30° e com um movimento suave distende-se o

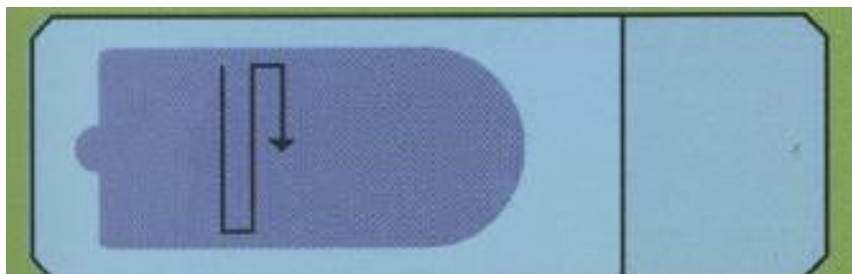
sangue até formar uma camada fina e delgada. Logo após recobriu-se o esfregaço sanguíneo com o corante May Grünwald e deixou-se atuar por 3 minutos. Após este período, lavou-se com água levemente. Logo em seguida, acrescentou-se o corante de Giemsa diluído e deixou agir por 15 minutos. Decorrido o tempo, enxaguou-se com água e colocou-se a lâmina para escorrer e secar. Com a lâmina seca acrescentou-se uma gota do meio de montagem Entellan Merck® e colocou-se a lamínula 25x60mm até a gota espalhar. Em seguida, a lâmina foi guardada em caixa própria para posterior leitura.

4.2.10 Análise e fotomicrografia das lâminas

As lâminas foram fotomicrografadas em objetiva de imersão com aumento de 1000 vezes utilizando o microscópio ABX OLIMPUS® localizado no Núcleo de Imunopatologia Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

O microscópio possui câmera acoplada e software para processamento das imagens. A leitura foi realizada segundo o método em Ameia, em que um número de 100 neutrófilos foi fotografado em leitura vertical de cima para baixo (e vice versa) como o objetivo de obter homogeneidade na leitura. As fotos armazenadas em pendrive para posterior contagem e medição da área dos vacúolos.

Figura 4 – Representação do processo de leitura das lâminas

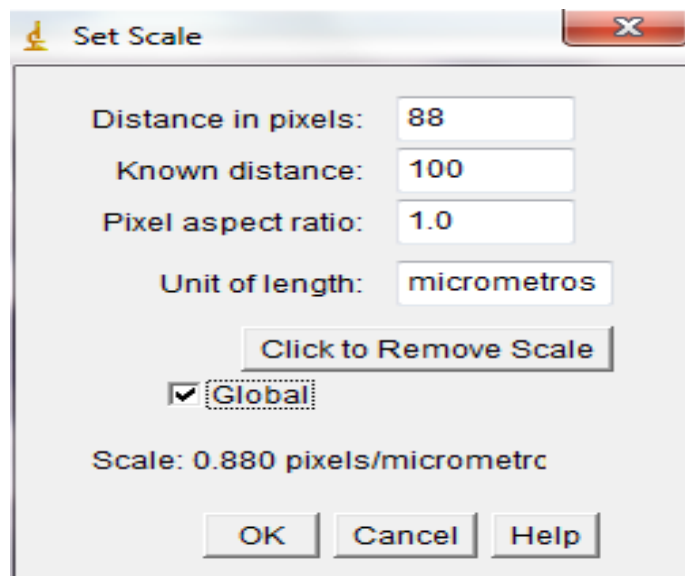


Fonte: Modificado de Bain (2004)

4.2.11 Contagem e medições dos vacúolos nos neutrófilos

Depois de fotografadas, as imagens foram processadas no software Image J. Primeiramente realizou-se uma calibração no software para que a leitura seja compatível com o software utilizado pelo microscópio, conforme figura abaixo. Logo após abrir o programa, clica-se na tecla “Open”, seleciona-se a imagem no computador. Em seguida, clica-se em “Set Scale” e inseriu-se a calibração conforme figura abaixo:

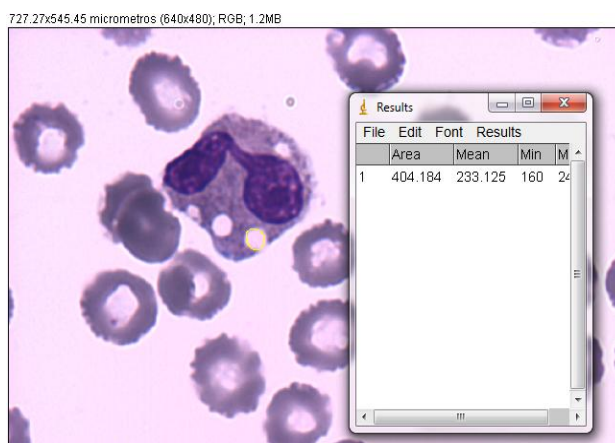
Figura 5 – Parâmetros utilizados para calibração do software de medição da área



Fonte: Software Image J versão 1.4

Logo após realizaram-se as medições conforme representação abaixo:

Figura 6 - Exemplo de medição de vacúolo de neutrófilo



Fonte: Software Image J versão 1.4

4.3 Método estatístico

Primeiramente realizaram-se os testes de normalidade dos parâmetros a serem analisados. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk detectaram a inexistência de normalidade das variáveis contínuas incluídas no teste ($p < 0,05$). Em seguida, realizou-se o teste não paramétrico de Mann – Whitney para verificar a diferença entre o grupo controle e grupo choque. Após a realização do teste, obteve-se um $p < 0,05$ para área e número de vacúolos no núcleo e citoplasma dos

neutrófilos, rejeitando – se a hipótese nula para igualdade entre os grupos avaliados, com 95 % de confiança. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de média (Tabelas 1 a 8). Para verificação da correlação entre as variáveis, realizou-se a correlação de Spearman (Tabela 9). Em relação à possibilidade da correlação entre múltiplas variáveis, realizou-se análise multivariada através da regressão linear. O teste foi realizado entre número e área dos vacúolos no citoplasma e as variáveis clínicas e laboratoriais, conforme apresentado abaixo. (Tabelas 10 e 11). Para as análises acima citadas utilizou-se o Programa SPSS Statistics versão 17.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A evolução clínica dos pacientes foi baseada nos parâmetros de pressão arterial, frequência cardíaca, necessidade de ventilação mecânica, etc, conforme em anexo (Anexo C). Esses parâmetros foram medidos de maneira contínua de modo a permitir que em cada tempo de coleta de sangue para análise dos vacúolos pudesse ser feita correlação com os valores de medidas clínicas encontradas. Os dados laboratoriais pertinentes estão expostos em anexo (Anexo D). Conforme se verifica a determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos foram feitos, também, nos mesmos tempos estabelecidos para coleta de sangue nos grupos controle e no grupo de pacientes com choque. A contagem do número de vacúolos/neutrófilos e a medida das respectivas áreas foram realizadas em ambos os grupos de pacientes. Verificou-se que os pacientes do grupo controle apresentavam, em sua maioria, neutrófilos não vacuolizados, ao contrário do observado nos pacientes com choque hemorrágico nos quais os esfregaços demonstraram neutrófilos com vacúolos de diversos tamanhos, localizados predominantemente no citoplasma (91%), mas presentes também no núcleo. Devido a este fato, optou-se pela correlação clínica somente com os vacúolos do citoplasma. Como as contagens e medições das áreas dos vacúolos foram realizadas nos tempos pré-determinados, foi possível fazer correlação entre o número e área dos vacúolos com a evolução clínica e laboratorial dos pacientes.

5.1 Caracterização da população estudada

As amostras foram coletadas no Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves no período de 01/11/20011 a 30/07/2012.

5.1.1 Grupo Controle

Foram coletadas amostras de 20 pacientes do sexo masculino vítimas de trauma sem evoluir para choque hemorrágico com idade média de $29,6 \pm 9,81$ anos. Devido ao pouco tempo de permanência no hospital, não foi possível coletar todas as amostras de sangue para análise morfométrica dos vacúolos contidos no citoplasma, nesse grupo.

5.1.2 Grupo Choque

Foram coletadas amostras de 20 pacientes do sexo masculino vítimas de choque hemorrágico com idade média de $26,65 \pm 10,6$ anos. Dos 20 pacientes, 19 foram vítimas de trauma por arma de fogo e um de acidente automobilístico. O tempo de trauma variou de instantes há 1 hora.

5.2 Caracterização morfométrica dos vacúolos nos grupos controle e choque

Na tabela 1, a média obtida refere-se ao número de vacúolos/neutrófilo no citoplasma do grupo controle em cada tempo de coleta.

Tabela 1 - Representação do número de vacúolos por neutrófilo contidos no citoplasma dos neutrófilos de pacientes vítimas de trauma leve (grupo controle)

	MÉDIA ± EPM NÚMERO DE VACÚOLOS	DESVIO PADRÃO
GRUPO CONTROLE	CITOPLASMA	CITOPLASMA
T1	0,033 ± 0,01	0,23
T6	0,081 ± 0,01	0,38
T12	0,081 ± 0,02	1,1
T18	0,051 ± 0,01	0,38
T24	0,047 ± 0,01	0,28
T48	0,053 ± 0,01	0,35
T72	0,076 ± 0,01	0,47

T1 (Tempo de coleta o mais próximo da ocorrência do trauma), T6, T12, T18, T24, T48, T72 (intervalos sucessivos de coleta em horas após a coleta em T1). Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

A média do número de vacúolos no citoplasma/neutrófilo apresentando vacuolização, de pacientes do grupo choque nos diversos tempos de coleta de sangue está representada na tabela 2.

Tabela 2 – Número de vacúolos/neutrófilo contidos no citoplasma do grupo de pacientes com choque grave.

	MÉDIA ± EPM NÚMERO DE VACÚOLOS	DESVIO PADRÃO
GRUPO CHOQUE	CITOPLASMA	CITOPLASMA
T1	0,514 ± 0,03	1,3
T6	0,578 ± 0,03	1,51
T12	0,613 ± 0,04	1,69
T18	0,497 ± 0,04	1,62
T24	0,648 ± 0,03	1,47
T48	0,555 ± 0,03	1,53
T72	0,501 ± 0,03	1,39

T1 (Tempo de coleta o mais próximo da ocorrência do trauma), T6, T12, T18, T24, T48, T72 (intervalos sucessivos de coleta em horas após a coleta em T1). EPM (Erro padrão da média) e respectivo desvio padrão referente à média calculada. Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

Em seguida, na tabela 3, encontram-se os dados referentes à soma da área média dos vacúolos/neutrófilo contidos no citoplasma do Grupo controle.

Tabela 3 – Análise morfométrica da área em μ^2 dos vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos do grupo controle, representada como media ± EPM.

	MÉDIA DA ÁREA DE VACÚOLOS (μ^2)	DESVIO PADRÃO
GRUPO CONTROLE	CITOPLASMA	CITOPLASMA
T1	2,816 ± 0,46	20,40
T6	7,656 ± 0,46	40,28
T12	4,677 ± 0,69	30,99
T18	6,628 ± 1,17	52,52
T24	3,975 ± 0,61	27,23
T48	5,132 ± 0,75	33,68
T72	6,003 ± 0,83	36,91

T1 (Tempo de coleta o mais próximo da ocorrência do trauma), T6, T12, T18, T24, T48, T72 (intervalos sucessivos de coleta em horas após a coleta em T1). Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

A tabela 4 refere-se à soma da área média dos vacúolos/neutrófilo contidos no citoplasma de do grupo choque nos respectivos tempos de coleta.

Tabela 4 – Análise morfométrica da área dos vacúolos em μ^2 contidos no citoplasma dos neutrófilos do grupo choque, representada como média \pm EPM.

GRUPO CHOQUE	MÉDIA DA ÁREA DE VACÚOLOS (μ^2)	DESVIO PADRÃO
	CITOPLASMA	CITOPLASMA
T1	64,018 \pm 4,04	180,65
T6	60,054 \pm 3,88	173,29
T12	71,699 \pm 4,90	217,47
T18	58,731 \pm 3,97	177,38
T24	88,538 \pm 4,81	215,15
T48	55,151 \pm 3,76	168,04
T72	63,056 \pm 4,34	194,22

T1 (Tempo de coleta o mais próximo da ocorrência do trauma), T6, T12, T18, T24, T48, T72 (intervalos sucessivos de coleta em horas após a coleta em T1). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

Na tabela 5, encontram-se os dados referentes à média do número de vacúolos/neutrófilo contidos no núcleo do grupo controle.

Tabela 5 - Representação do número de vacúolos contidos no núcleo do grupo controle, como média \pm Erro padrão da média (EPM).

GRUPO CONTROLE	MÉDIA DO NÚMERO DE VACÚOLOS	DESVIO PADRÃO
	NÚCLEO	NÚCLEO
T1	0,003 \pm 0,0010	0,054
T6	0,006 \pm 0,0010	0,077
T12	0,008 \pm 0,0010	0,062
T18	0,004 \pm 0,0001	0,005
T24	0,001 \pm 0,0007	0,035
T48	0,002 \pm 0,0010	0,047
T72	0,005 \pm 0,0017	0,074

T1 (Tempo de coleta o mais próximo da ocorrência do trauma), T6, T12, T18, T24, T48, T72 (intervalos sucessivos de coleta em horas após a coleta em T1). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

A tabela 6 refere-se à média do número de vacúolos/neutrófilo no núcleo do grupo choque nos respectivos tempos de coleta.

Tabela 6 - Representação do número de vacúolos contidos no núcleo do grupo choque como média \pm Erro padrão da média (EPM)

GRUPO CHOQUE	MÉDIA DO NÚMERO DE VACÚOLOS NÚCLEO	DESVIO PADRÃO NÚCLEO
T1	0,032 \pm 0,005	0,245
T6	0,044 \pm 0,007	0,357
T12	0,075 \pm 0,03	1,688
T18	0,049 \pm 0,008	0,387
T24	0,078 \pm 0,011	0,483
T48	0,029 \pm 0,004	0,209
T72	0,091 \pm 0,038	1,679

T1 (Tempo de coleta o mais próximo da ocorrência do trauma), T6, T12, T18, T24, T48, T72 (intervalos sucessivos de coleta em horas após a coleta em T1). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015.

Na tabela 7, encontram-se os dados referentes à área média de vacúolos/neutrófilo no núcleo dos neutrófilos do grupo controle.

Tabela 7 – Análise morfométrica da área dos vacúolos em μ^2 contidos no núcleo dos neutrófilos do grupo controle, representada como média \pm EPM.

GRUPO CONTROLE	MÉDIA DA ÁREA DE VACÚOLOS (μ^2) NÚCLEO	DESVIO PADRÃO NÚCLEO
T1	0,143 \pm 0,06	2,77
T6	0,476 \pm 0,21	9,27
T12	0,185 \pm 0,12	5,19
T18	0,299 \pm 0,11	4,79
T24	0,035 \pm 0,02	1,07
T48	0,108 \pm 0,06	2,57
T72	0,323 \pm 0,11	4,81

T1 (Tempo de coleta o mais próximo da ocorrência do trauma), T6, T12, T18, T24, T48, T72 (intervalos sucessivos de coleta em horas após a coleta em T1). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

A tabela 8 refere-se à média da área de vacúolos/neutrófilo no núcleo do grupo choque.

Tabela 8 - Análise morfométrica da área dos vacúolos em μ^2 contidos no núcleo dos neutrófilos do grupo choque, representada como média \pm EPM.

GRUPO CHOQUE	MÉDIA DA ÁREA DOS VACÚOLOS (μ^2)	DESVIO PADRÃO
	NÚCLEO	NÚCLEO
T1	2,914 \pm 0,57	25,71
T6	2,003 \pm 0,35	15,74
T12	1,983 \pm 0,42	18,58
T18	3,209 \pm 0,70	31,63
T24	5,148 \pm 0,74	33,21
T48	4,242 \pm 0,92	41,07
T72	4,090 \pm 0,78	35,10

T1 (Tempo de coleta o mais próximo da ocorrência do trauma), T6, T12, T18, T24, T48, T72 (intervalos sucessivos de coleta em horas após a coleta em T1). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

O teste de Man – Whitney detectou a diferença entre o grupo choque e o grupo controle com $p < 0,05$ com 95% de confiança para área e número de vacúolos no citoplasma e no núcleo, rejeitando-se a hipótese nula para a igualdade entre os grupos.

Os dados contidos na tabela 9 referem-se ao coeficiente de correlação de Spearman e valor de significância (p valor) após agruparem-se os respectivos dados referentes aos parâmetros clínicos e laboratoriais em cada tempo com o número ou área média em cada tempo de coleta.

Tabela 9 - Correlação de Spearman para comparação entre área e número de vacúolos com parâmetros clínicos e laboratoriais.

Parâmetros clínicos e laboratoriais		Número de Vacúolos	Área de Vacúolos
		Citoplasma	Citoplasma
Frequência cardíaca	Correlação	0,355	0,39
	Valor p	< 0,05	< 0,05
Dose de Noradrenalina	Correlação	0,089	0,165
	Valor p	0,303	0,056
Pressão arterial	Correlação	-0,119	-0,136
	Valor p	0,193	0,137
pH Arterial	Correlação	-0,299	-0,345
	Valor p	< 0,05	< 0,05
Lactato	Correlação	0,608	0,644
	Valor p	< 0,05	< 0,05
Global de leucócitos	Correlação	0,068	0,055
	Valor p	0,53	0,615
% de Neutrófilos Segmentados	Correlação	-0,238	-0,286
	Valor p	< 0,05	< 0,05
Número absoluto de Neutrófilo Segmentado	Correlação	0,216	0,235
	Valor p	< 0,05	< 0,05
% de Neutrófilo Bastonete	Correlação	0,259	0,314
	Valor p	< 0,05	< 0,05
Número absoluto de Neutrófilo Bastonete	Correlação	0,227	0,235
	Valor p	< 0,05	< 0,05
Número de Vacúolos no Citoplasma	Correlação	-	0,934
	Valor p	-	< 0,05

Frequência cardíaca (quantidade de batimentos por minuto realizado pelo coração), Dose de noradrenalina (quantidade de noradrenalina infundida em mg a cada hora); Pressão arterial média (média entre a pressão sistólica e diastólica após cálculo específico), pH arterial (medida do pH do sangue arterial através da gasometria); Lactato (Ácido Láctico); Global de Leucócitos (contagem de leucócitos no em mm³); % de neutrófilos segmentados(porcentagem de neutrófilos em relação a global de leucócitos); Número absoluto de neutrófilo segmentado (contagem absoluta de neutrófilos em mm³); % de neutrófilo bastonete (porcentagem de neutrófilo bastonete em relação a global de leucócitos); Número absoluto de neutrófilo bastonete(contagem absoluta de neutrófilo bastonete); Número de vacúolos no citoplasma (número médio dos vacúolos no citoplasma após soma do número de vacúolos em todos os tempos de coleta); Área de vacúolos no citoplasma (área média dos vacúolos após a soma das áreas em todos os tempos de coleta); Correlação (coeficiente de correlação de Spearman); p (valor p de significância estatística).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

A tabela 10 demonstra os valores da regressão linear multivariada. Após correlação clínica e laboratorial com a área dos vacúolos no citoplasma, verificou-se que a frequência cardíaca e o lactato, apresentaram correlação significativa.

Tabela 10 - Análise de Regressão linear multivariada em relação à área de vacúolos no citoplasma.

	Valor beta	Coefficiente beta	Valor p	R ajustado
Frequência Cardíaca	0,374	0,326	< 0,05	0,624
Lactato	18,097	0,508	< 0,05	0,624

O valor p calculado para frequência cardíaca refere-se ao intervalo de 0,10 a 0,649 com 95% de confiança. O valor p calculado em relação ao lactato refere-se ao intervalo de 9,58 a 26,60 com 95% de confiança. Frequência cardíaca (batimentos por minuto pelo coração); Lactato (Ácido Láctico); Valor beta (Ex: A variação da frequência cardíaca correlaciona-se com uma variação na área dos vacúolos de 0,374 μ^2), coeficiente beta (coeficiente da equação de regressão linear); valor p (valor para significância estatística) R ajustado (correlação após ajuste da equação de regressão linear).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Após análise de regressão linear multivariada a frequência cardíaca e o lactato correlacionaram-se significativamente com a área dos vacúolos, com um r ajustado de 0,624 e com significância estatística ($p < 0,05$).

Na tabela 11, o número de vacúolos correlacionou-se com a frequência cardíaca e o lactato, após análise multivariada.

Tabela 11 - Análise de Regressão linear multivariada em relação ao número de vacúolos no citoplasma.

	Valor beta	Coefficiente beta	Valor p	R ajustado
Frequência Cardíaca	0,04	0,450	< 0,05	0,634
Lactato	0,113	0,391	< 0,05	0,634

O valor p calculado para frequência cardíaca refere-se ao intervalo de 0,02 a 0,06 com intervalo de confiança (IC) de 95%. O valor p calculado em relação ao lactato refere-se ao intervalo de 0,045 a 0,181 com 95% de confiança. Frequência cardíaca (batimentos por minuto pelo coração); lactato (ácido láctico); Valor beta (Ex: A variação encontrada na frequência cardíaca corresponde a uma variação de 0,04 no número de vacúolos); coeficiente beta (coeficiente da equação de regressão linear); valor p (valor para significância estatística); R ajustado (correlação após ajuste da equação de regressão linear).

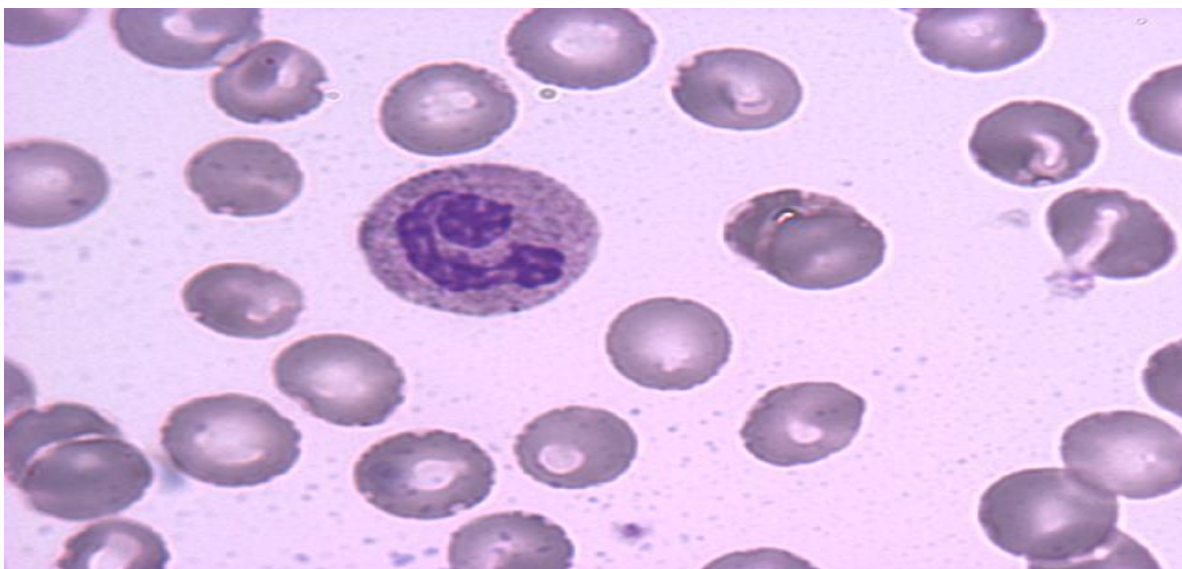
Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Após análise de regressão linear multivariada a frequência cardíaca e o lactato correlacionaram-se significativamente com o número dos vacúolos, com um r ajustado de 0,634 e com significância estatística ($p < 0,05$).

5.3 Ilustrações dos vacúolos na população estudada.

Na figura 7, encontra-se a foto de um neutrófilo pertencente ao grupo controle com ausência de vacuolizações no núcleo e no citoplasma.

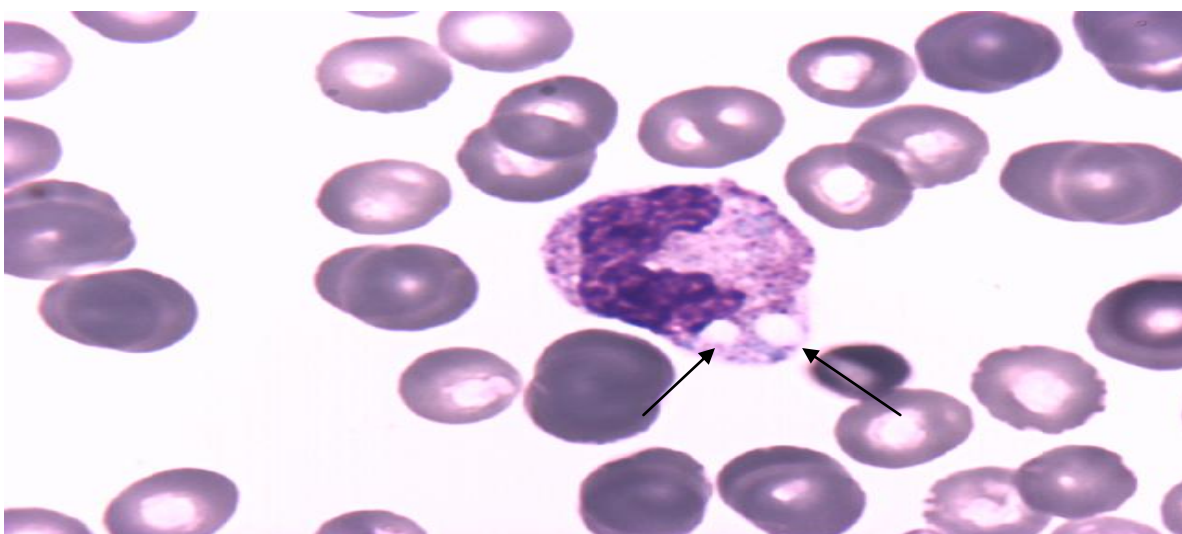
Figura 7 – Fotomicrografia de neutrófilo do grupo controle com ausência de vacúolo citoplasmático, de acordo com a metodologia utilizada. (Aumento de 1000 X).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Nas figuras 8, 9 e 10 encontram-se neutrófilos do Grupo Choque com diversos tamanhos de vacúolos citoplasmáticos.

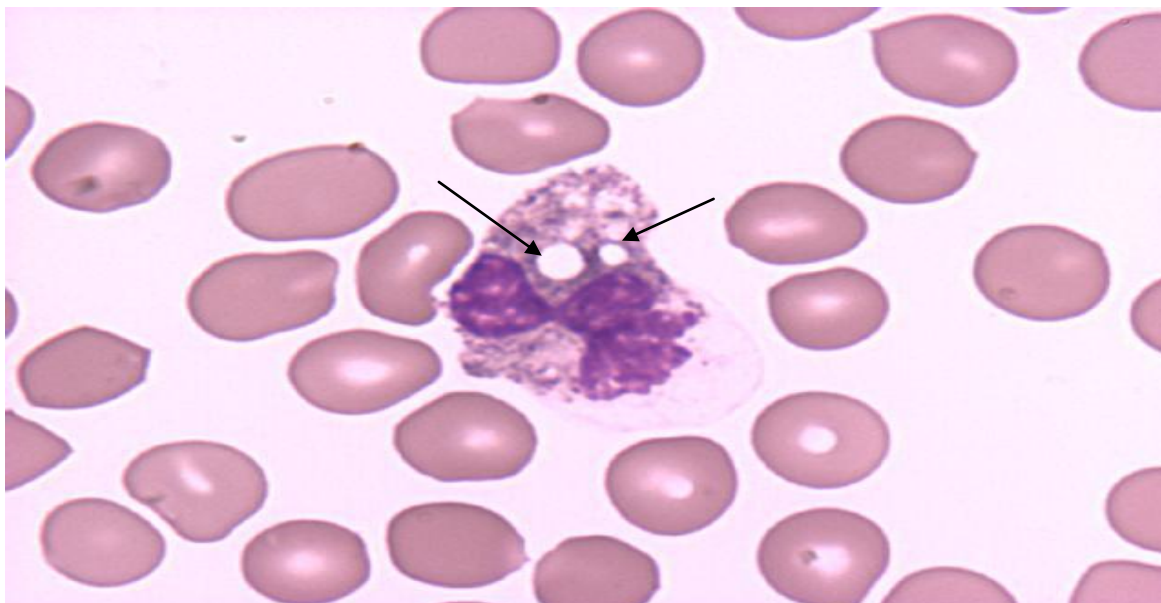
Figura 8 – Fotomicrografia de neutrófilo com granulações tóxicas e presença de vacúolos proeminentes no citoplasma. (Aumento de 1000 X)



Neutrófilo com vacúolos na parte inferior a direita.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

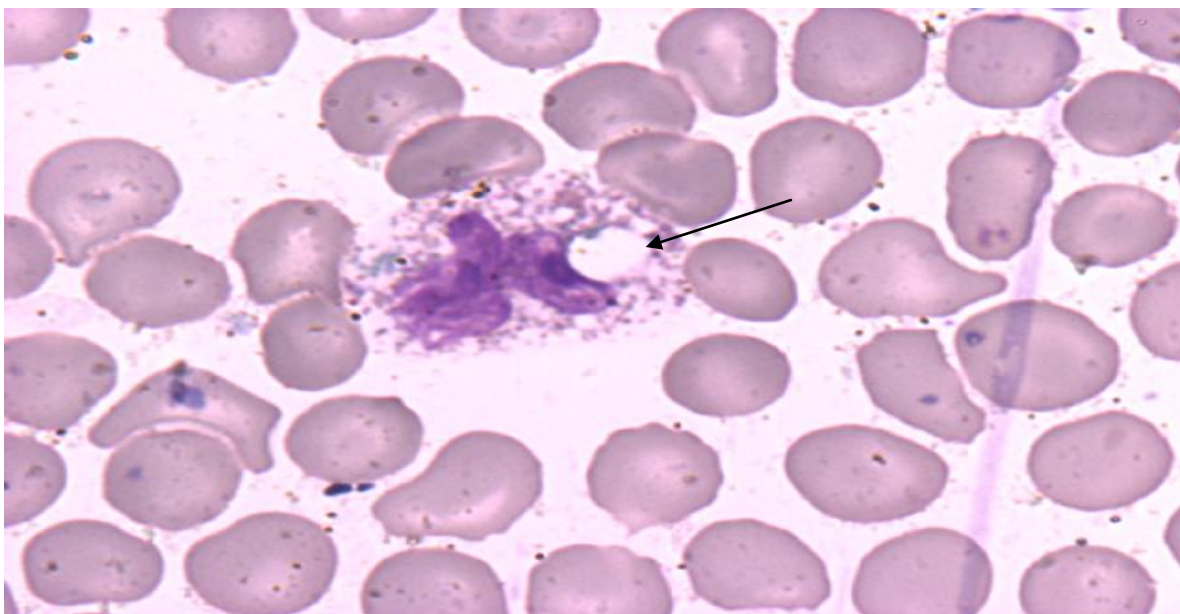
Figura 9 – Fotomicrografia de neutrófilo de paciente do grupo choque com presença de dois vacúolos maiores no citoplasma (Aumento de 1000 X)



Neutrófilo com dois vacúolos proeminentes e citoplasma mostrando perda de sua integridade na parte inferior.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Figura 10 – Fotomicrografia de neutrófilo de paciente do grupo choque com grande vacúolo citoplasmático (Aumento de 1000 X)



Neutrófilo com presença de grande vacúolo citoplasmático e outros vacúolos menores. Visualiza-se também a presença de granulações azurófilas e granulações tóxicas.

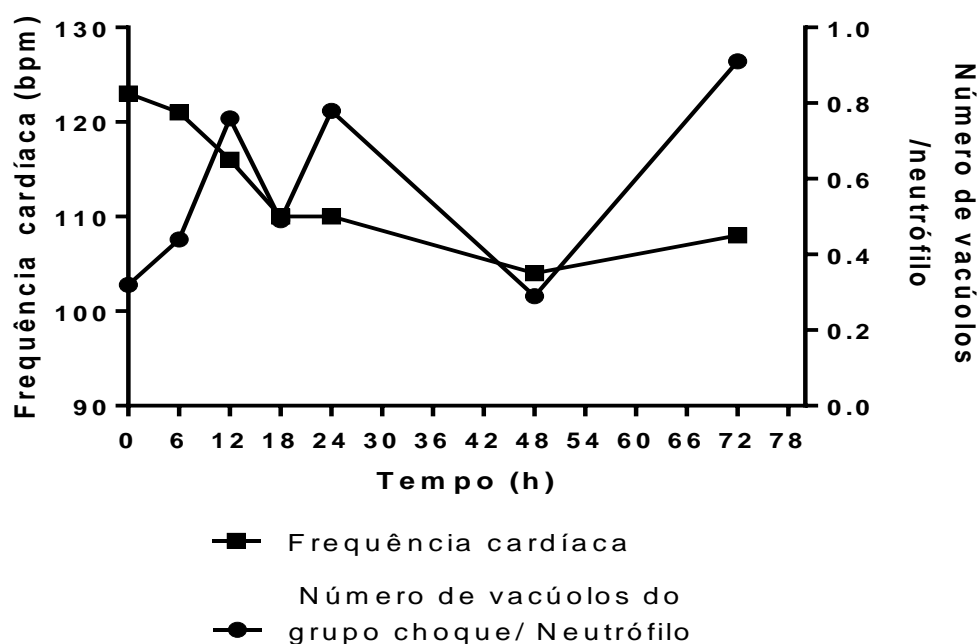
Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

5.4 Variáveis clínicas

5.4.1 Comparação entre frequência cardíaca e o número e área dos vacúolos

Na figura 11 está representada a comparação entre a frequência cardíaca e o número médio de vacúolos/neutrófilo do grupo choque em cada tempo de coleta.

Figura 11 – Frequência cardíaca média em bpm e número médio de vacúolos /neutrófilo dos pacientes do grupo choque. (n=20)

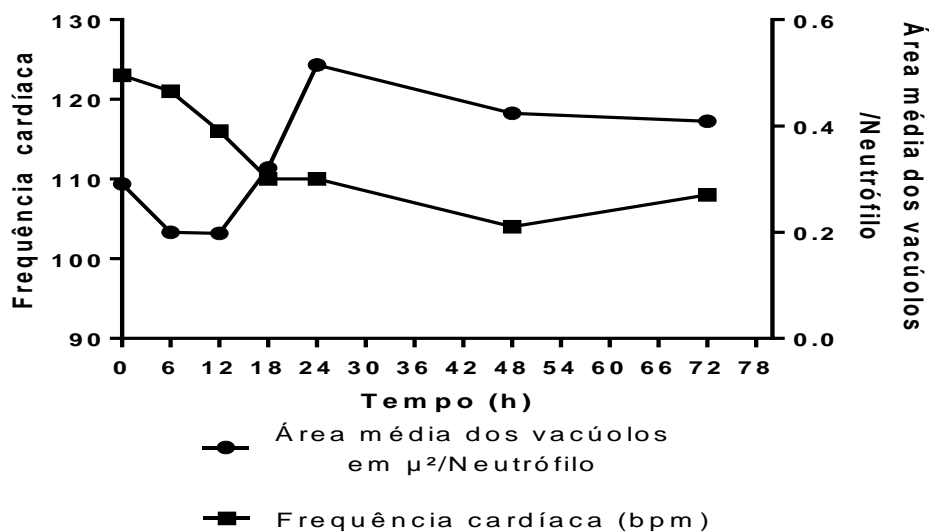


bpm (batimentos por minuto) R: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), h (tempo em horas das coletas realizadas).
 Dados estatísticos: r de Spearman: 0,355 e $p < 0,05$ (Tabela 9)
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Na fase aguda do choque hemorrágico observou-se uma diminuição da frequência cardíaca média e um aumento do número médio dos vacúolos até o tempo de 12 horas. Após o tempo 12 horas até o tempo 72 horas observou-se melhor correlação entre estas duas variáveis. A correlação de Spearman não é relevante a ponto de estabelecer uma correlação significativa entre as variáveis, apesar da significância estatística.

Na figura 12, observa-se a comparação entre frequência cardíaca e a área média de dos vacúolos nos neutrófilos do grupo choque.

Figura 12 - Frequência cardíaca média e área média dos neutrófilos de pacientes com choque hemorrágico (n=20) nos diversos tempos de coleta



r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), h (tempo em horas das coletas realizadas), Dados estatísticos: r de Spearman: 0,39 e $p < 0,05$ (Tabela 9).

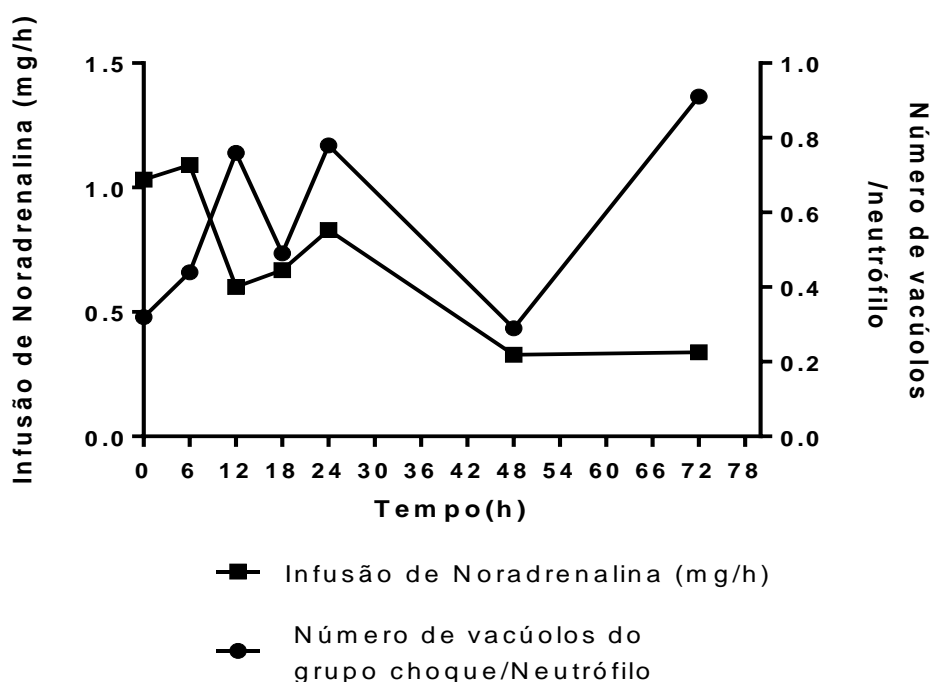
Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

Observou-se até o tempo 6 horas uma diminuição da frequência cardíaca média e da área dos vacúolos. Entre o tempo 6 e 12 horas a área dos vacúolos manteve-se praticamente constante. A partir do tempo 24 até o tempo 48 horas ocorreu um decréscimo das variáveis. Observou-se boa correlação entre as variáveis nos diversos tempos de coleta, apesar do r de Spearman não ser tão relevante para estabelecer uma boa relação entre as variáveis. As variáveis apresentaram significância estatística com $p < 0,05$.

5.4.2 Dose de Noradrenalina administrada em comparação ao número e área dos vacúolos em μ^2 .

Na figura 13, o número de vacúolos no citoplasma dos neutrófilos do grupo choque está comparado com a infusão de noradrenalina.

Figura 13 - Comparação entre a infusão média de noradrenalina em mg/h e o número de vacúolos.



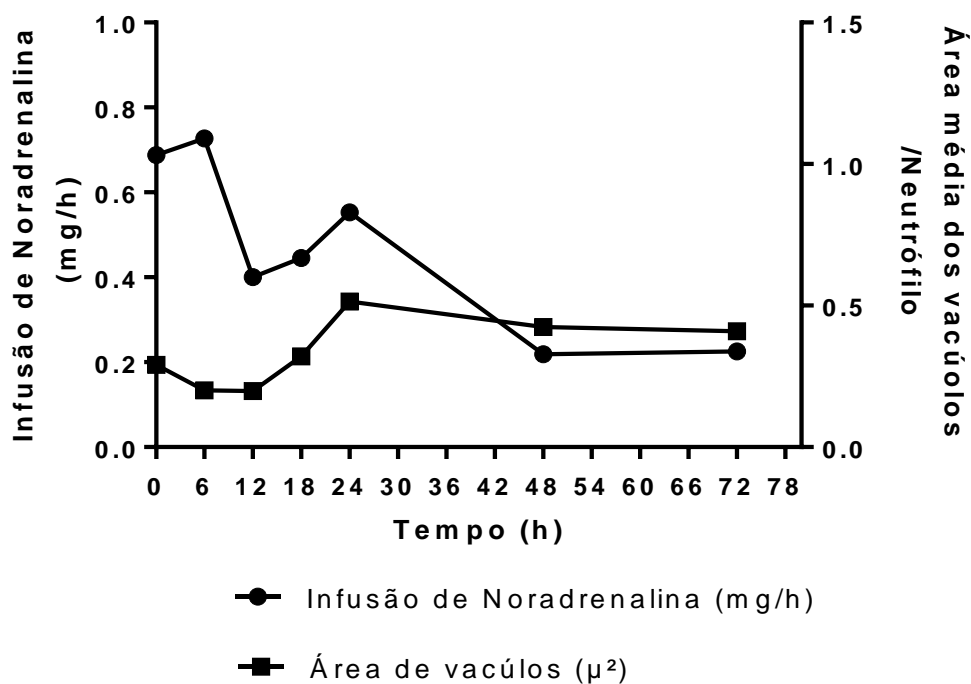
r: coeficiente de correlação de spearman, p: (valor p de significância estatística), h(tempo em horas das coletas realizadas). Dados estatísticos: r de spearman: 0,089 e p = 0,303 (tabela 9).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Analisando somente o gráfico, observou-se boa correlação entre as variáveis, principalmente entre o tempo 24 e 48 horas, em que ambas apresentaram diminuição significativa. Contudo, não houve significância estatística entre as variáveis ($p > 0,05$).

Observa-se na figura 14 a comparação entre a infusão de noradrenalina e a área média de vacúolos dos neutrófilos do grupo choque.

Figura 14 - Comparação entre a área média dos vacúolos em μ^2 por neutrófilo e a dose média de Noradrenalina administrada no grupo choque (n=20)



r: Coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), h(tempo em horas das coletas realizadas). r de Spearman: 0,165 e valor $p=0,193$ (Tabela 9 Fonte:

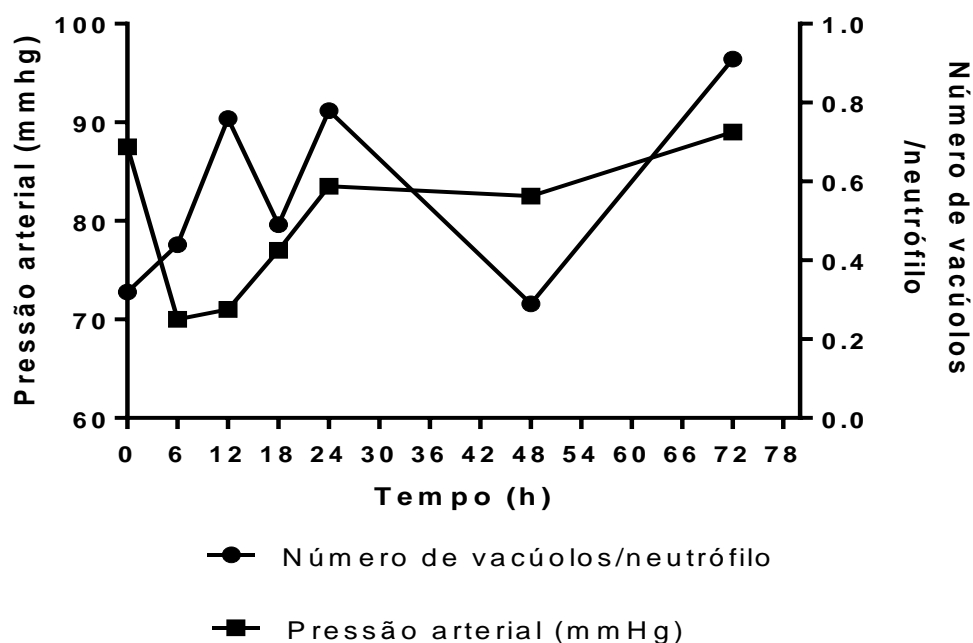
Elaborado pelo autor, 2015

Analisando - se o gráfico é possível observar que as duas variáveis se comportam de maneira semelhante durante os tempos analisados. Entre os tempos 0 e 12 horas ambas apresentaram decaimento. O mesmo acontecendo entre os tempos 24 e 48 horas. No intervalo entre 48 e 72 horas ambas tenderam a se manter praticamente constantes. Não houve significância estatística entre as variáveis ($p > 0,05$).

5.4.3 Comparação entre o número e área dos vacúolos com a pressão arterial média.

Na figura 15 o número médio de vacúolos no citoplasma dos pacientes do grupo choque está comparado com a pressão arterial média em cada tempo em que foi realizada a coleta sanguínea.

Figura 15 - Comparação entre o número médio de vacúolos e a pressão arterial média em mmHg do grupo choque (n=20).



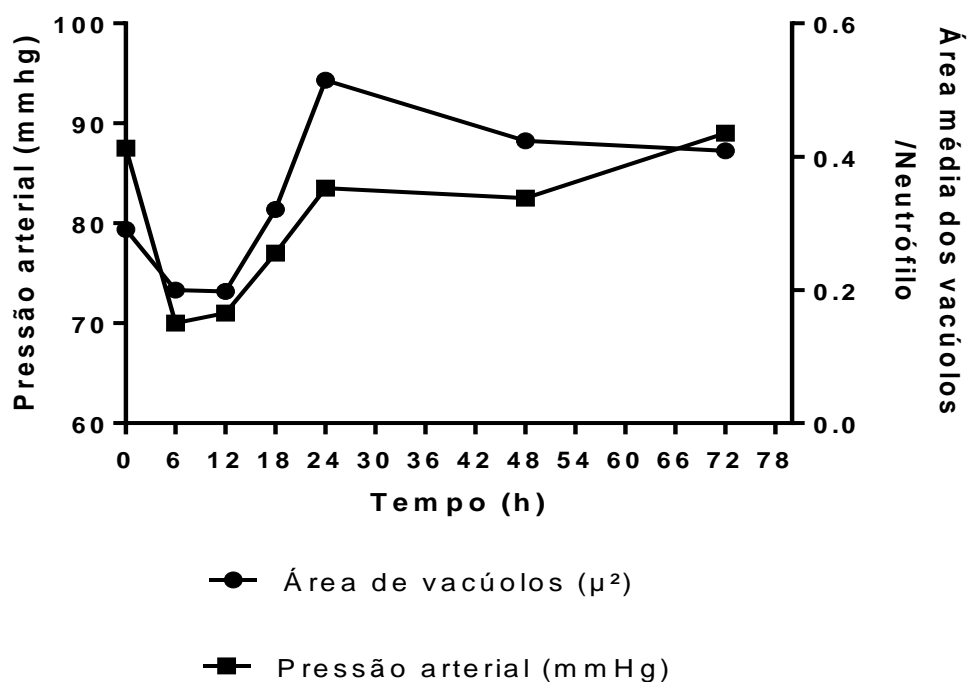
r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), h(tempo em horas das coletas realizadas), R de Spearman: -0,119 e p = 0,193 (Tabela 9).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Observou-se correlação inversa entre as duas variáveis na fase aguda do choque hemorrágico entre os tempos 0 e 18 horas. Nos demais tempos não houve correlação entre as variáveis. Também, não houve significância estatística entre as variáveis ($p > 0,05$).

A figura 16 estabelece a comparação entre a pressão arterial média e a área de vacúolos no citoplasma dos neutrófilos dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 16 - Comparação entre a pressão arterial média em mmHg e área dos vacúolos/neutrófilo no grupo choque (N=20).



r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), h(tempo em horas das coletas realizadas). r de Spearman: -0,136 e p= 0,137 (Tabela 9)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

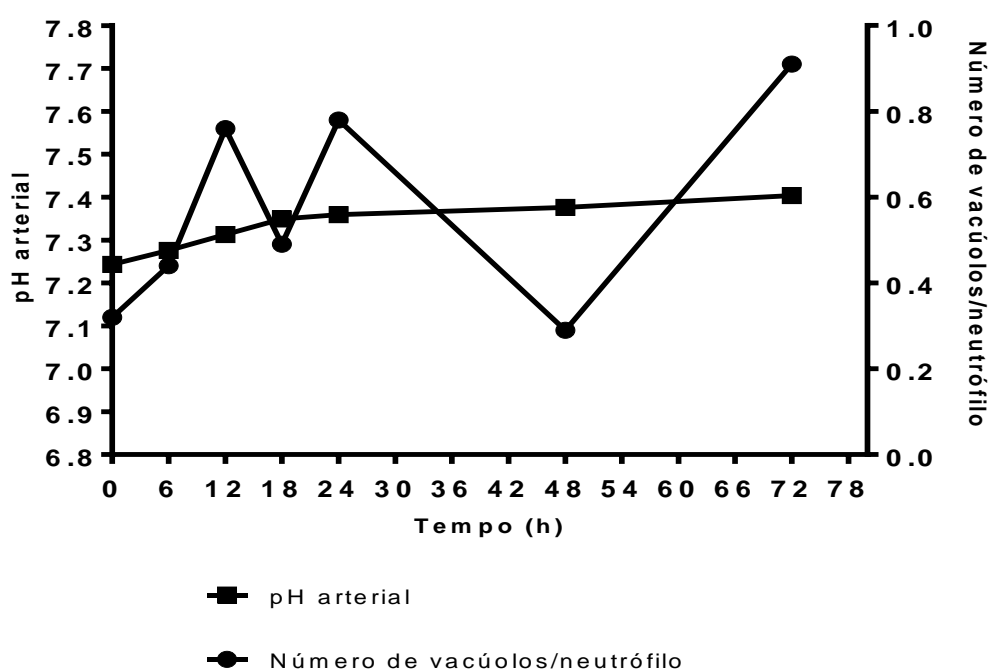
Na fase aguda do choque entre os tempos 0 e 12 horas as duas variáveis apresentaram diminuição média. No intervalo entre 12 e 24 horas ocorreu um aumento significativo de ambas. Entre 48 e 72 a correlação não apresentou o mesmo desempenho do intervalo anterior, mas as discrepâncias sugerem não serem muito significativas. Contudo após análise estatística, não houve significância estatística ($p > 0,05$) e r de Spearman apresenta correlação negativa muito baixa, não sendo possível estabelecer correlação entre as variáveis.

5.5 Variáveis Laboratoriais

5.5.1 Comparação entre o pH arterial médio e o número e área dos vacúolos

Na figura 17 compara-se a média do pH arterial médio em cada tempo de coleta com o número de vacúolos no citoplasma dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 17—Comparação entre o pH arterial média e o número de vacúolos por neutrófilo no grupo choque (N=20)



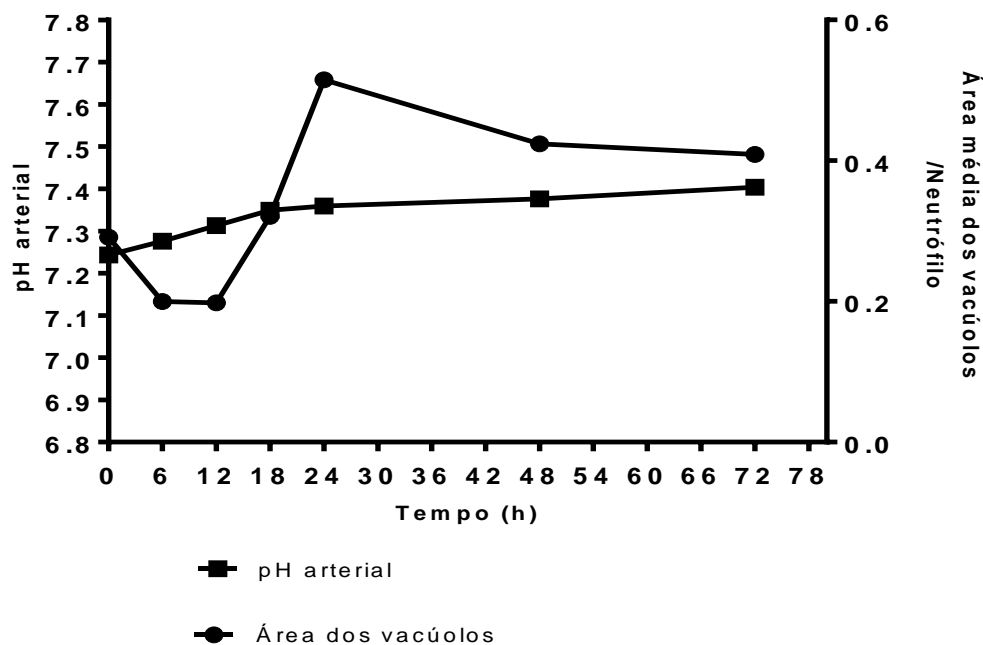
r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), pH (pH arterial médio), h(tempo em horas das coletas realizadas), r de Spearman: -0,299 e $p < 0,05$ (Tabela 9).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

O pH arterial médio apresentou intervalo curto de variação (7.243 a 7.404) conforme observado na figura acima. Contudo, alguns pacientes apresentaram acidose significativa conforme observado nos dados em anexo. O r de Spearman não foi significativo para estabelecer correlação entre as variáveis apesar da significância estatística ($p < 0,05$).

Na figura 18 compara-se o pH arterial médio em cada tempo de coleta com a média da área dos vacúolos no citoplasma dos neutrófilos dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 18– Comparação entre o pH arterial médio e área média dos vacúolos por Neutrófilo no Grupo Choque (n = 20).



r = coeficiente de correlação de Spearman, p : (valor p de significância estatística), pH (pH arterial médio), h (tempo em horas das coletas realizadas), r de Spearman: 0,345 e $p < 0,05$

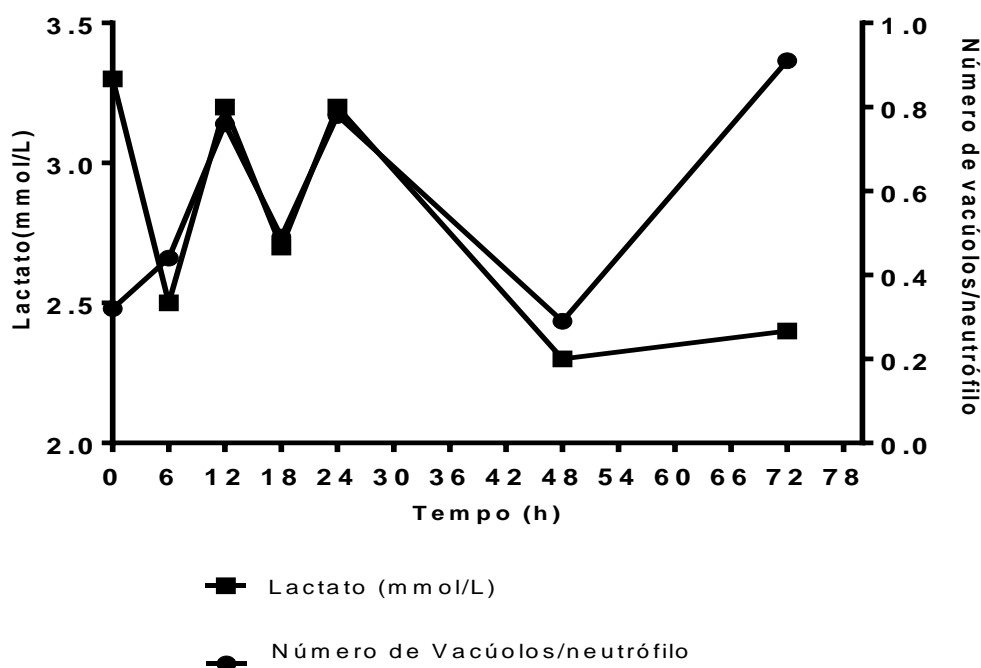
Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Na fase aguda do Choque do tempo 0 a 12 horas as duas variáveis sugerem correlacionar-se inversamente. Após o tempo de 12 horas o pH manteve-se praticamente constante e a área dos vacúolos apresentou um aumento até o tempo de 24 horas, apresentando uma queda do tempo 48 até às 72 horas. Observou-se significância estatística entre as variáveis ($p < 0,05$) mas o r de Spearman (-0,345) não foi o suficiente para estabelecer correlação entre as variáveis.

5.5.2 Comparação entre o lactato em mol/L com o número e a área dos vacúolos no citoplasma dos Neutrófilos.

Na figura 19 há a comparação entre o lactato e o número de vacúolos dos neutrófilos dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 19– Comparação entre o número de vacúolos e o lactato em mol/L dos pacientes do grupo Choque (n=20).

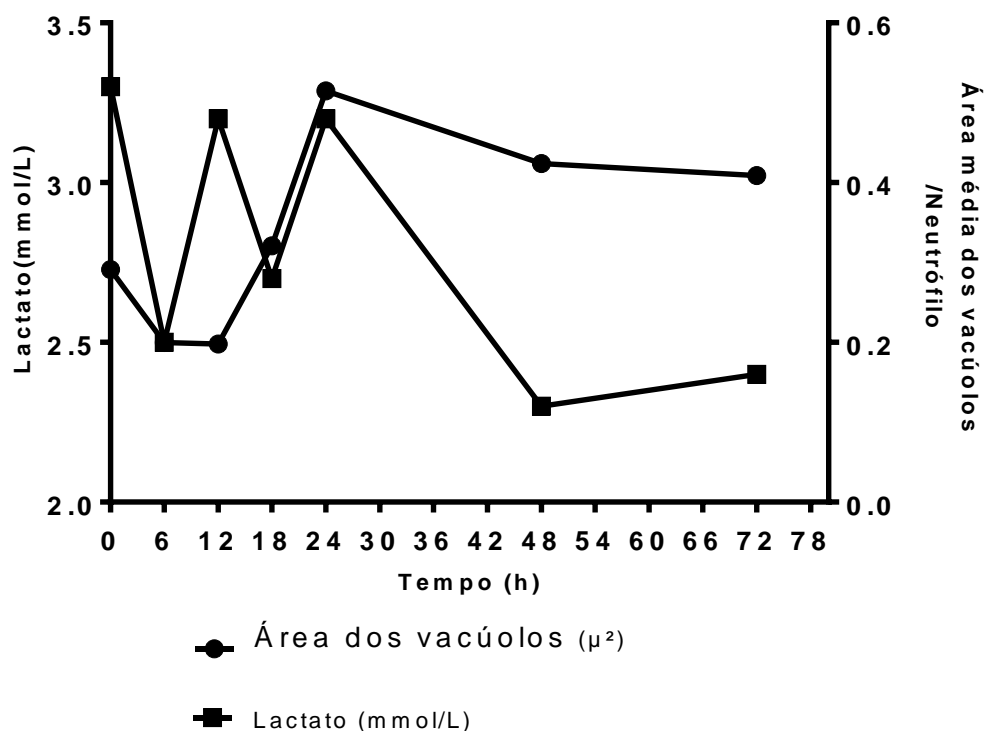


r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), Lactato (Ácido Láctico), (tempo em horas das coletas realizadas), r de Spearman: 0,608 e : p < 0,05 (Tabela 9)
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

O lactato médio apresentou pequena variação conforme verificado na figura acima (2,4 a 3,3 mmol/L), apesar de alguns pacientes apresentarem valores aumentados conforme em anexo. Apesar da pequena variação, observamos uma boa correlação entre as variáveis (r=0,608) e significância estatística (p<0,05). O resultado sugere relação entre as variáveis.

Na figura 20, compara-se os níveis de lactato com a área média dos vacúolos localizados no citoplasma dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 20 – Comparação entre a área dos vacúolos citoplasmáticos de pacientes com choque hemorrágico e níveis plasmáticos de lactato (n=20).



r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), Lactato (Ácido Láctico), (tempo em horas das coletas realizadas), r de Spearman: 0,644 e $p < 0,05$ (Tabela 9).

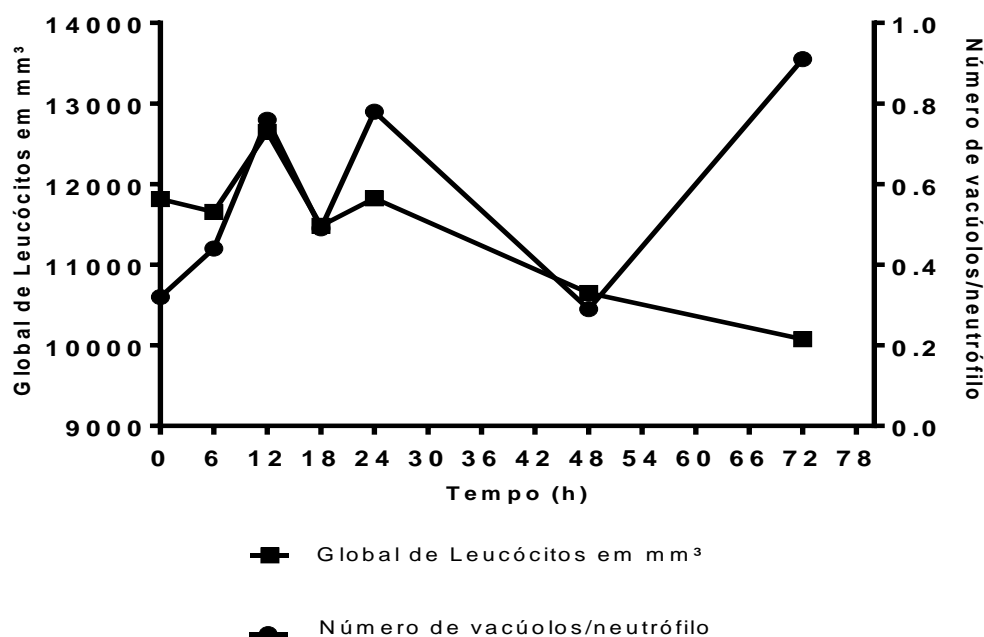
Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

A figura acima sugere melhor correlação entre as variáveis entre os tempos 18 e 24 horas. Há diminuição média das duas variáveis no estágio inicial (zero e seis horas) e comportamento inverso entre 12 e 18 horas. Apesar do observado, a correlação de Spearman de 0,644 com $p < 0,05$ demonstra correlação entre as variáveis.

5.5.3 Comparação entre a contagem global média de leucócitos por mm^3 e o número e área dos vacúolos no citoplasma do neutrófilo no grupo choque.

A figura 21 estabelece a comparação entre a contagem global média de leucócitos com o número de vacúolos no citoplasma dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 21 - Comparação entre a contagem global média de leucócitos e o número de vacúolos no Grupo Choque (n=20).



r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), Contagem global de Leucócitos: Número médio de leucócitos em mm^3 em cada tempo, h: (tempo em horas das coletas realizadas), r de Spearman: 0,068 e p= 0,615 (Tabela 9)

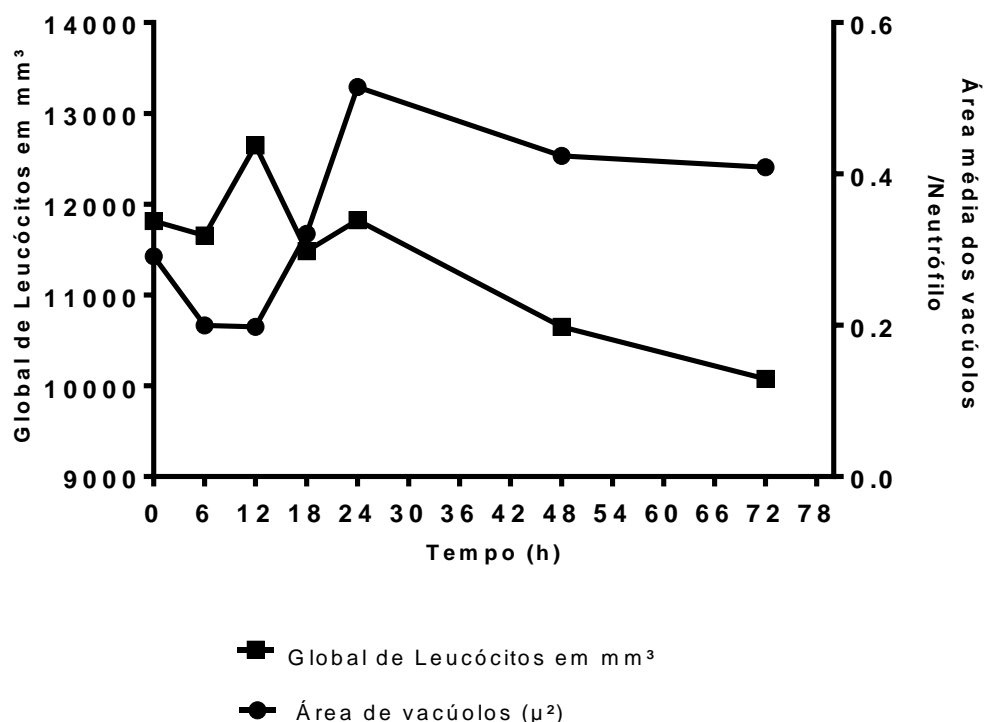
Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

A contagem global de Leucócitos apresentou pequena variação (10075 a 12647 leucócitos / mm^3), apesar de alguns pacientes apresentarem valores mais elevados. As duas variáveis apresentam excelente correlação entre os tempos 6 e 18 horas e uma boa correlação entre 18 e 48 horas.

Entretanto, após análise estatística, não houve significância estatística entre as variáveis ($p > 0,05$), descartando a possibilidade de correlação entre elas.

Na figura 22 estabelece-se a comparação entre a contagem global de leucócitos em cada tempo de coleta e a área de vacúolos no citoplasma de pacientes com choque hemorrágico.

Figura 22- Comparação entre a contagem global de leucócitos e a área de vacúolos no Grupo Choque (n=20).



r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), contagem global de leucócitos: número médio de leucócitos em mm³ em cada tempo, h: (tempo em horas das coletas realizadas). r de Spearman: 0,055 e p = 0,615 (Tabela 9).

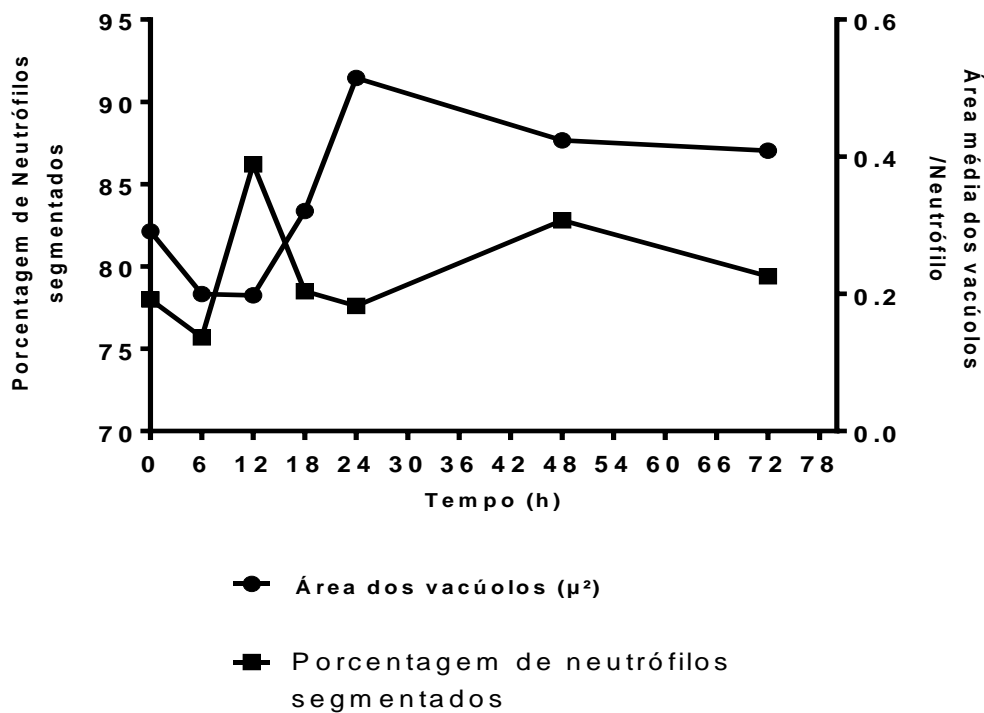
Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

A análise estatística mostrou não haver significância estatística entre o número global de leucócitos e o número de vacúolos ($p > 0,05$).

5.5.4 Comparação entre o percentual de neutrófilos no grupo choque (n=20) e o número e área dos vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos.

Na figura 23 compara-se o percentual de neutrófilos segmentados em relação à área dos vacúolos localizados no citoplasma dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 23 - Comparação entre o percentual de neutrófilos segmentado em relação à área de vacúolos em μ^2 no grupo choque (n=20).



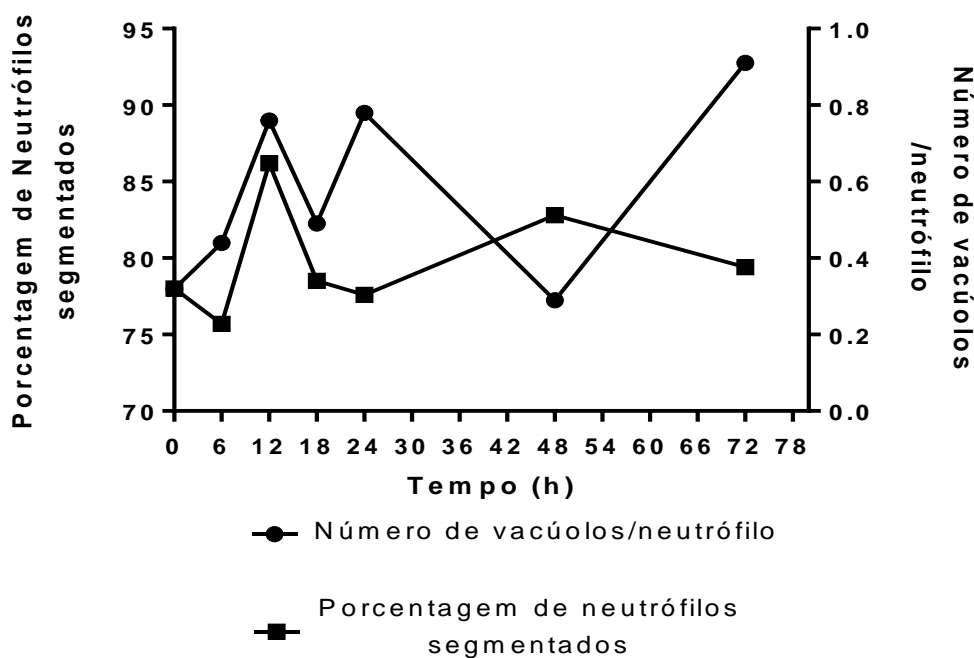
r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), % de Neutrófilos (porcentagem de neutrófilos em relação a global de leucócitos, h: (tempo em horas das coletas realizadas), r de Spearman: -0,238 e $p < 0,05$ (Tabela 9).

Fonte Elaborado pelo autor, 2015

Observa-se uma correlação negativa entre o percentual de neutrófilos segmentado e o aumento da área dos vacúolos no intervalo de 12 a 48 horas. Entre zero e seis horas ocorreu diminuição das duas variáveis. O coeficiente de Spearman mostrou tendência para correlação negativa entre as variáveis. Contudo, o valor de $r = -0,238$ descartou a possibilidade de correlação apesar de haver significância estatística ($p < 0,05$),

Na figura 24, compara-se o percentual de neutrófilos segmentados com o número de vacúolos localizados no citoplasma dos neutrófilos dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 24 – Comparação entre o percentual de neutrófilos segmentados em relação ao número de vacúolos no grupo choque (n=20).



r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), % de Neutrófilos (porcentagem de neutrófilos segmentados em relação a global de leucócitos, h: (tempo em horas das coletas realizadas), r de Spearman: -0,286 e $p < 0,05$ (Tabela 9).

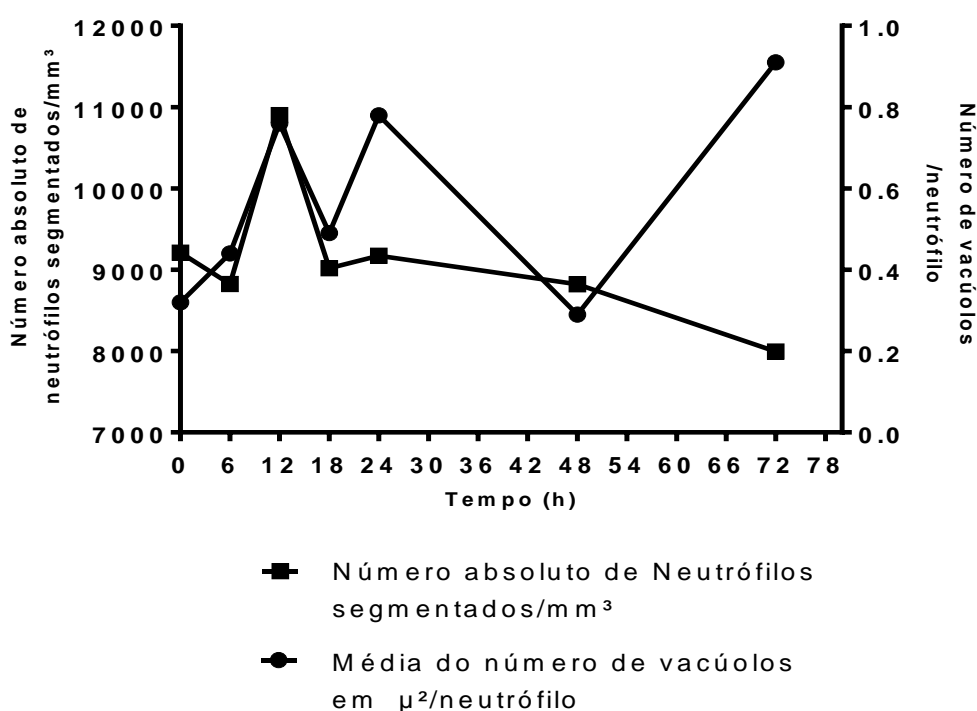
Fonte Elaborado pelo autor, 2015.

Observa-se correlação positiva entre as variáveis no intervalo entre seis e 18 horas e correlação negativa entre os tempos 24 e 72 horas. Houve diferença significativa entre as variáveis ($p < 0,05$), contudo com r de Spearman de - 0,286, não significativo para estabelecer correlação entre as variáveis.

5.5.5 Comparação entre o número absoluto de neutrófilos segmentados com o número e a área dos vacúolos contido no citoplasma dos neutrófilos do grupo choque.

Na figura 25 estabelece-se a comparação entre o número absoluto médio de neutrófilos segmentados e o número de vacúolos localizados no citoplasma dos neutrófilos dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 25 – Comparação entre o número absoluto médio de neutrófilos em mm^3 do Grupo Choque (n=20) e o número de vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos.



r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), número absoluto de neutrófilos (número absoluto de neutrófilos em mm^3 em relação a global de leucócitos, h: (tempo em horas das coletas realizadas), r de Spearman: 0,216 Valor P: < 0,05 (Tabela 9).

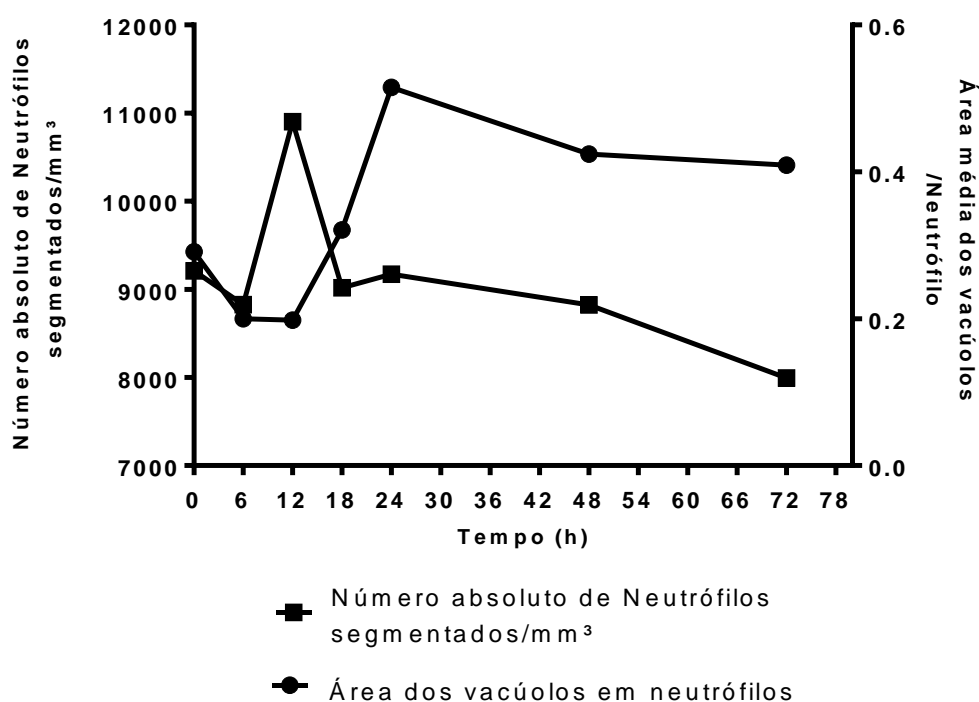
Fonte Elaborado pelo autor, 2015

O número absoluto de neutrófilos segmentado médio variou entre 8823 e 10902 neutrófilos/ mm^3 em relação ao número global de leucócitos. Observou-se correlação entre as variáveis no intervalo de seis a 18 horas. No intervalo de 48 e 72 horas houve significância estatística entre as variáveis ($p < 0,05$), mas o coeficiente de correlação de Spearman de 0,216 não é suficiente para estabelecer correlação entre elas.

5.5.6 Comparação entre o número absoluto de neutrófilos e a área e número de vacúolos.

Na figura 26 compara-se o número absoluto médio de neutrófilos segmentados com a área média dos vacúolos dos neutrófilos dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 26 – Comparação entre o número absoluto médio de neutrófilos no grupo choque (n=20) e a área média dos vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos em μ^2 por neutrófilo.



r: coeficiente de correlação de Spearman, p: (valor p de significância estatística), número absoluto de neutrófilos (número absoluto de neutrófilos segmentados em mm^3 em relação a global de leucócitos, h: (tempo em horas das coletas realizadas), r de Spearman: 0,235 e $p < 0,05$ (Tabela 9).

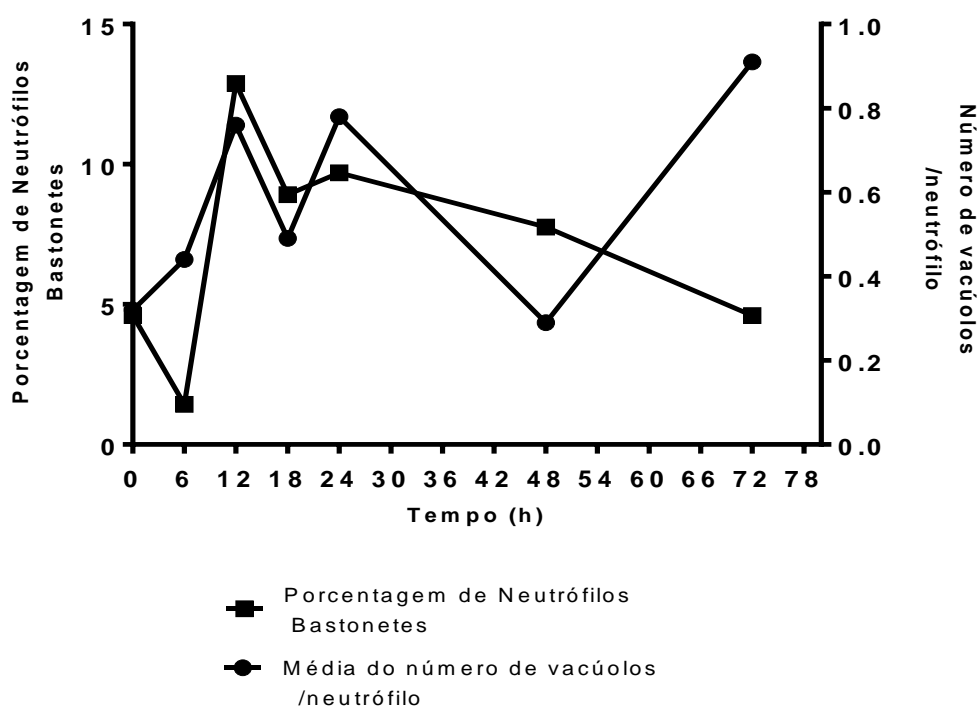
Fonte Elaborado pelo autor, 2015

Observa-se que as duas variáveis apresentam uma ligeira diminuição entre o tempo 0 e seis horas e apresentam comportamento inverso entre 12 e 18 horas. Entre os tempos de 24 e 72 horas ambas apresentam comportamento semelhante. Houve significância estatística entre as variáveis ($p < 0,05$), mas com um baixo coeficiente de correlação de Spearman (0,235).

5.5.7 Comparação entre a porcentagem de bastonetes e o número e área dos vacúolos no citoplasma dos neutrófilos do grupo choque.

Na figura 27, a porcentagem média de neutrófilos bastonetes é comparada com o número de vacúolos localizados no citoplasma dos neutrófilos dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 27- Comparação entre a porcentagem de bastonetes e o número de vacúolos contidos no citoplasma dos neutrófilos nos pacientes do grupo choque (n=20).



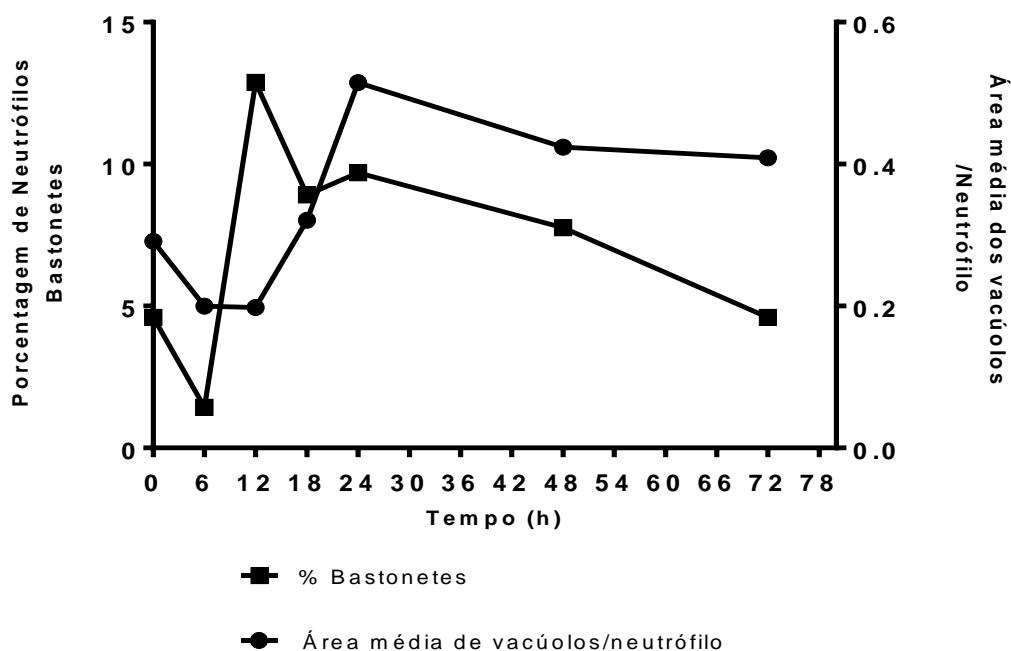
Porcentagem de bastonetes (porcentagem de bastonetes em relação a global de leucócitos). Média do número de vacúolos/Neutrófilo (quantidade média de vacúolos por neutrófilo em cada tempo de coleta), r de Spearman: Coeficiente de correlação de Spearman, p (valor de significância estatístico p), h (tempo em horas das coletas realizadas) r de Spearman: 0,259 e $p < 0,05$ retirados da tabela 9.

Fonte: Elaborado pelo autor

A porcentagem média de bastonetes variou entre 1,43 a 12,88 %. Através da análise inicial da figura observa-se uma boa correlação entre as variáveis no intervalo de 12 a 18 horas e uma correlação negativa entre 0 e 6 e 48 a 72 horas. Contudo, após análise estatística, observou-se um r de Spearman positivo, contrariando o esperado, e não suficiente para estabelecer uma relação, apesar do $p < 0,05$.

Abaixo, na figura 28, a porcentagem média de bastonetes é comparada com a área dos vacúolos no citoplasma dos neutrófilos dos pacientes com choque hemorrágico.

Figura 28 - Comparação entre a porcentagem de bastonetes e a área dos vacúolos contidos no citoplasma dos pacientes do grupo choque ($n=20$).



Porcentagem de bastonetes (porcentagem de bastonetes em relação a global de leucócitos). Média do número de vacúolos/Neutrófilo (quantidade média de vacúolos por neutrófilo em cada tempo de coleta), R de Spearman: Coeficiente de correlação de Spearman, p (valor de significância estatística em nível de 95%), h (tempo em horas das coletas realizadas), r de Spearman: 0,314 e $p < 0,05$ (Tabela 9)

Fonte: Elaborado pelo autor

Inicialmente observou-se diminuição discreta das variáveis no intervalo de 0 a seis horas. No intervalo de 12 e 18 horas ocorreu diminuição média na variável bastonete e aumento na área média dos vacúolos. Após análise estatística, obteve-se significância estatística entre as variáveis ($p < 0,05$).

5.5.8 Porcentagem e número absoluto de neutrófilos com vacúolo.

Na figura 12 estão apresentados os dados da porcentagem de neutrófilos com vacúolos no citoplasma dos pacientes com choque hemorrágico. Após leitura dos 2000 neutrófilos em cada tempo de coleta, considerou-se neutrófilo com vacúolo o neutrófilo com pelo menos um vacúolo no citoplasma. Após calcular a quantidade total de neutrófilos com vacúolos, dividiu-se o resultado pelo total de neutrófilos em cada tempo. O resultado obtido foi usado para calcular a porcentagem de neutrófilos com vacúolo em relação à porcentagem de neutrófilos jovens e segmentados em cada tempo de coleta contidos no leucograma.

Tabela 12 – Porcentagem média de neutrófilos com vacúolo e neutrófilos jovens e segmentados em cada tempo de coleta no grupo choque.

Tempo (h)	Porcentagem de neutrófilos com vacúolo	Porcentagem de neutrófilos jovens e segmentados
T1	27,98	82,55
T6	29,29	77,16
T12	24,02	99,08
T18	22,76	87,45
T24	30,36	87,27
T48	21,43	90,60
T72	24,30	83,95

T1 (Tempo de coleta o mais próximo da ocorrência do trauma), T6, T12, T18, T24, T48, T72 (intervalos sucessivos de coleta em horas após a coleta em T1).

Fonte: Elaborado pelo autor

Exemplo: Tempo 1 – 23,10 % de neutrófilos com vacúolos.

Porcentagem de neutrófilos jovens e segmentados no Tempo 1 – 82,55%

82,55%.....100%

23,10%.....X

X = 27,98% de neutrófilos com vacúolo no Tempo 1.

Na tabela 13 obteve-se o número absoluto médio de neutrófilos com vacúolos. Após leitura dos 2000 neutrófilos em cada tempo de coleta, considerou-se neutrófilo com

vacúolo o neutrófilo com pelo menos um vacúolo no citoplasma. O valor calculado na tabela 12 foi aplicado à média do número global de leucócitos em cada tempo de coleta.

Tabela 13 – Número absoluto de neutrófilos com vacúolos e número absoluto de neutrófilos jovens e segmentados no grupo choque.

Tempo (h)	Número Absoluto de neutrófilos com vacúolo (mm³)	Número Absoluto de neutrófilos jovens e segmentados (mm³)
T1	2728,96	9753,28
T6	2633,80	8992,45
T12	3009,99	12530,02
T18	2284,92	10040,62
T24	3133,36	10319,08
T48	2068,34	9649,67
T72	2055,29	8457,92

T1 (Tempo de coleta o mais próximo da ocorrência do trauma), T6, T12, T18, T24, T48, T72 (intervalos sucessivos de coleta em horas após a coleta em T1).

Fonte: Elaborado pelo autor

Exemplo:

Tempo 1 – 27,98 % de neutrófilos com vacúolos entre neutrófilos.

$9753,28 \times 27,98\% = 2729,96$ neutrófilos com vacúolo

Na tabela 14, os dados referem-se à porcentagem de neutrófilos com pelo menos um vacúolo no grupo controle. Observa-se grande diferença em relação ao grupo choque.

Tabela 14 - Porcentagem de neutrófilos com vacúolo no grupo controle.

Tempo (h)	Porcentagem de neutrófilos com vacúolo
T1	2,82
T6	5,8
T12	3,73
T18	3,29
T24	3,75
T48	3,3
T72	6

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro a comparar o número e a área de vacúolos nos neutrófilos de pacientes com choque hemorrágico e a buscar a correlação desta alteração citoplasmática com apoptose de neutrófilos e alterações clínicas e laboratoriais em pacientes com choque hemorrágico. A literatura para apoptose em neutrófilos humanos em pacientes com choque hemorrágico é escassa.

Em relação aos parâmetros clínicos avaliados, o estado de choque provoca aumento da frequência cardíaca (Guyton e Hall, 2006). O aumento da frequência cardíaca está relacionado com a gravidade do trauma e é critério de avaliação da magnitude da resposta inflamatória sistêmica. (Ware e Matthay, 2000). Observou-se frequência cardíaca média mínima de 110 e máxima de 125 bpm. Avaliada separadamente por meio da correlação de Spearman, a frequência cardíaca apresentou baixa correlação com o número (0,355) e com a área dos vacúolos (0,39) com $p < 0,05$. Isso talvez possa ser explicado, considerando a gravidade do trauma dos pacientes. Dezenove dos 20 pacientes com choque grave foram vítimas de traumatismo por arma de fogo. Nesses casos, a tendência é de que a frequência cardíaca esteja em patamares superiores à normal e a pequena variação entre os valores médio, mínimo e máximo observados poderiam ter atenuado a possível correlação entre a vacuolização citoplasmática observada em muitos pacientes e a variação da frequência cardíaca.

Em relação a parâmetros laboratoriais, o lactato apresentou correlação direta com o aparecimento de vacúolos no citoplasma. Sabe-se que o lactato apresenta excelente aplicação clínica na avaliação da resposta inflamatória dos pacientes. Quanto maior o nível sérico de lactato, maior a mortalidade em pacientes com choque hemorrágico (Yamazaki, 2006). O resultado da correlação de Spearman de 0,608 em relação ao número e de 0,644 em relação à área dos vacúolos ($p < 0,05$) sugere que o lactato esteja relacionado com o processo de vacuolização. Se esse parâmetro se correlaciona com o número e área de vacúolos citoplasmáticos, é possível que a obtenção de esfregaços de sangue periférico possa vir a se constituir em bom marcador para previsão da gravidade do caso. O aumento do lactato é observado nos pacientes em terapia intensiva com resposta inflamatória exacerbada e está associado com a maior mortalidade desses pacientes. O lactato é um

marcador de hipóxia tecidual e tem seu valor aumentado quando a célula deixa de produzir energia pela via aeróbia e passa a utilizar a via fermentativa (Tietz, 2008). A hipóxia pode ocasionar lesão nas membranas celulares e aumentar a taxa de apoptose devido ao aumento dos radicais superóxido. (Robbins, 2006) Os radicais oxigenados estão na via de formação dos vacúolos. Levando-se em consideração que no choque hemorrágico a hipóxia está presente durante o insulto, esta privação de oxigênio indiretamente medida pelo lactato, aumentaria a taxa de apoptose em neutrófilos e conseqüentemente o número e área dos vacúolos (Mihalache *et al.*, 2011), conforme mecanismo ilustrado na figura 3.

No presente trabalho outro parâmetro analisado na tentativa de correlação com vacuolização de neutrófilos foi a dose de noradrenalina administrada ao paciente. A administração de noradrenalina está relacionada com a ativação da enzima NADPH oxidase em monócitos, com conseqüente produção de radicais superóxidos (DEO SH, 2013). Esta ativação faz parte do mecanismo de formação de vacúolos em neutrófilos (Mihalache *et al.*, 2011) conforme mecanismo ilustrado na figura 3. Neste estudo não houve significância estatística entre dose de noradrenalina e número e área de vacúolos. Contudo, esse estudo seria enriquecido pela análise da correlação entre doses de noradrenalina e ativação da NADPH oxidase em neutrófilos, o que poderá constituir desdobramento do trabalho no futuro.

A queda da pressão arterial é frequente no choque hemorrágico pela hipovolemia. Quanto maior a gravidade do choque, tanto maior a queda da pressão arterial, com conseqüente diminuição do débito cardíaco e da oferta oxigênio para os tecidos. A queda da pressão arterial está relacionada com a mortalidade hospitalar no choque hemorrágico (Dutton, 2002). No presente trabalho não se observou correlação entre a diminuição da pressão arterial e o aumento da área e do número de vacúolos. É possível que a infusão de cristalóides e noradrenalina no intuito de corrigir a pressão arterial nos diversos tempos estudados tenham impedido a correlação negativa entre diminuição da pressão arterial e aumento do número de vacúolos, porquanto a pressão arterial foi mantida artificialmente elevada.

As grandes variações de pH podem ocasionar lesão da membrana celular, aumento da peroxidação lipídica e aumento das taxas de morte por autofagia (Robbins, 2006). Ao avaliar este parâmetro, esperava-se que a diminuição brusca do pH causasse aumento do número e área dos vacúolos, ou seja,

correlação negativa com valores de r próximos de -1 . O resultado sugere ausência de correlação negativa, possivelmente devido à pequena variação da faixa de pH médio observado neste estudo (7,243 a 7,376) e as possíveis correções da acidose feitas pelo intensivista, pela administração de bicarbonato.

Buscou-se correlacionar o leucograma com contagem global e/ou específica de neutrófilos segmentados com o número e a área dos vacúolos. Era de se esperar que com o aumento do número e área dos vacúolos ocorresse diminuição dos leucócitos circulantes devido ao aumento da morte dos neutrófilos, ou seja, um r negativo entre as variáveis próximo de -1 . Contudo, o r de Spearman foi próximo de zero e não houve significância estatística entre a contagem global de leucócitos e o número e área dos vacúolos. ($p > 0,05$). É possível que este resultado seja devido ao pequeno intervalo dos valores médios observados para o número global de leucócitos (10075 a 12647/mm³; dados retirados das figuras 20 e 21) o que pode comprometer os testes de correlação. Outra hipótese para explicar a falta de correlação seria o fato de a produção medular de neutrófilos manter-se proporcional ou superior à destruição dessas células, de modo que o número global de leucócitos não apresente diminuição significativa, mesmo na ocorrência de índices altos de morte celular (21,43% a 30,36% -Tabela 13).

Ocorreu baixa correlação entre a porcentagem de neutrófilos e a formação intracitoplasmática de vacúolos nos neutrófilos segmentados. A expectativa era de que o aumento do número/área dos vacúolos se correlacionasse com diminuição dos neutrófilos circulantes, considerando que a vacuolização está relacionada com a morte celular. Conforme explicado no item anterior, a diminuição periférica causada pela morte dos neutrófilos consequente à vacuolização e migração dos neutrófilos para os tecidos é compensada pela produção medular, mascarando possível correlação entre as variáveis.

A porcentagem de neutrófilos com vacúolos em relação ao total de neutrófilos totais variou entre 21,43 a 30,36% (Tabela 13). Nas primeiras 72 horas do trauma a taxa de apoptose manteve-se praticamente constante. Este dado, juntamente com a baixa elevação da média dos valores da contagem global de leucócitos, sugere que a destruição dos neutrófilos decorrente da formação de vacúolos pode ser importante mecanismo de controle da resposta inflamatória decorrente do trauma. Esta hipótese foi confirmada por Morrison, CA et al., 2013 em

que o aumento da apoptose em pacientes sépticos e não sépticos está correlacionado com a menor resposta inflamatória sistêmica. A porcentagem de neutrófilos encontrada neste trabalho é semelhante à encontrada por Mihalache *et al.*, 2011 no estudo de neutrófilos de pacientes com artrite reumatóide e fibrose cística, em que foram encontrados 20% de vacuolização. Em estudo envolvendo pacientes sépticos e não sépticos. Morrison, CA *et al.*, 2013 encontraram 72% de neutrófilos em apoptose, valor superior aos 20% encontrados no presente estudo, em pacientes não sépticos.

Comparou-se o número absoluto e a porcentagem de neutrófilos bastonetes com o número e a área dos vacúolos contidos nos neutrófilos. O bastonete é a forma jovem do neutrófilo. Quando lançado na circulação periférica indica maior atividade de produção medular (Lorenzi, 2006). Era de se esperar que, com a taxa de apoptose variando aproximadamente entre 21,43% a 30,36%, ocorresse correlação positiva com r de Spearman próximo de 1, ou seja, um aumento da destruição periférica corresponderia a um aumento dos neutrófilos jovens na circulação. Pode-se especular que o valor de r não foi próximo de 1 devido a possível diferença entre o intervalo de aparecimento dos vacúolos e morte celular e a liberação celular do bastonete pela medula óssea.

Após análise multivariada dos dados, a frequência cardíaca e o lactato correlacionaram-se positivamente com a variação observada no número e área dos vacúolos com r ajustado de 0,634 e 0,624 respectivamente. Esta correlação sugere que a gravidade do trauma relacionada com as alterações bioquímicas decorrentes do insulto aumentam, em número e área, os vacúolos nos neutrófilos. A vacuolização é marcador aceito de autofagia e morte celular (Mihalache *et al.*, 2011).

Os vacúolos citoplasmáticos nos neutrófilos de pacientes vítimas de trauma, evoluindo com choque hemorrágico, poderiam indicar que essa categoria de pacientes seriam predispostos a cursar com resposta inflamatória mais intensa e prognóstico mais reservado.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- Pacientes vítimas de traumatismo, evoluindo com choque hemorrágico, apresentam vacúolos no núcleo e no citoplasma dos neutrófilos do sangue periférico, em número e área significativamente maiores do que pacientes vítimas de trauma sem evolução com choque hemorrágico.
- A frequência cardíaca de pacientes vítimas de choque hemorrágico por trauma apresenta correlação com o número e com a área dos vacúolos citoplasmáticos; dos neutrófilos.
- Os níveis sanguíneos de lactato se correlacionam de forma direta com a formação de vacúolos citoplasmáticos de neutrófilos de pacientes com choque hemorrágico.
- Os parâmetros pressão arterial, dose de noradrenalina, contagem global de leucócitos, número absoluto e percentual de neutrófilos segmentados e porcentagem de bastonetes não apresentam correlação direta com a formação de vacúolos em neutrófilos.

PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

- Correlacionar o nível das interleucinas com o número e a área dos vacúolos utilizando o soro dos pacientes que constituíram a casuística desse estudo, estocados em freezer a -80°C .
- Caracterizar as granulações tóxicas e quantificar os lóbulos dos neutrófilos em cada tempo de coleta.
- Pesquisar fármacos que atuem na via da Proteína PI3K, NADPH oxidase e endossomas, contendo CD44, visando modular a resposta inflamatória no choque hemorrágico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKGUL C, MOULDING DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. **FEBS Lett** 2001; 487:318:22

BAIN JB. Diagnosis from the blood smear. **N Eng J Med** 2005; 353: 498 – 507

BONE RC, SIBBALD WJ, SPRUNG CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest** 1992;101:1481-3.

BOTHA AJ, MOORE FA, MOORE EE, KIM FJ, BANERJEE A, PETERSON VM. Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. **Surgery** 1995;118:358-64.

COOK-MILLS, J.M & DEEM, T.L. Active participation of endothelial cells in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology** 2005; 77:487-95.

CHETTY-RAJU, N.; COOK, R.; ERBER, W. N. Vacuolated neutrophils in ethanol toxicity. **Br J Haematol** 2004; 12:478.

DEO SH, JENKINS NT, PADILLA J, PARRISH AR, FADEL PJ. Norepinephrine increases NADPH oxidase-derived superoxide in human peripheral blood mononuclear cells via α -adrenergic receptors. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 2013; 305:1124-32.

DONNELLY SC, STRIETER RM, KUNKEL SL, WALZ A, ROBERTSON CR, CARTER DC, et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in atrisk patient groups. **Lancet** 1993; 341:643-7.

DONNELLY TJ, MEADE P, JAGELS M, CRYER HG, LAW MM, HUGLI TE, et al. Cytokine, complement, and endotoxin profiles associated with the development of

the adult respiratory distress syndrome after severe injury. **Crit Care Med** 1994;22:768-76.

DURU, F.; GUMRUK, F.; GURGEY, A. Vacuolated white blood cells in thalassemia major. **Turk J Pediatr** 1994; 36:255-8

DUTTON RP, MACKENZIE CF, SCALEA TM. Hypotensive resuscitation during active hemorrhage: impact on in-hospital mortality. **J Trauma** 2002; 52: 1141-6

FUJISHIMA S, AIKAWA N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. **Intensive Care Med** 1995; 21:277-85.

GUYTON, ARTHUR C.; HALL, JOHN E. Tratado de fisiologia médica 11 ed. Rio de Janeiro: **Elsevier** 2006; p.263 – 70.

HENSLER T, SAUERLAND S, BOUILLON B, RAUM M, RIXEN D, HELING HJ, ET AL. Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. **J Trauma** 2002; 52:962-70.

KONG SE, BLENNERHASSETT LR, HEEL KA, MCCAULEY RD, HALL JC. Ischaemia reperfusion injury to the intestine. **Aust N Z J Sur** 1998; 68:554-61.

KRAMMER PH. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature** 2000; 407: 789-95.

KROEMER G, DALLAPORTA B, RESCHE-RIGON M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis e necrosis. **Annual Review of Physiology** 1998; 60:619-42.

KROEMER G. Introduction: mitochondrial control of apoptosis. **Biochimie** 2002; 84:103-4.

KROEMER G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. **Cell Death and Differentiation** 1998; 5: 546-7

KROFT, S. H. Infectious diseases manifested in the peripheral blood. **Clin Lab Med** 2002; 22: 253-77.

LORENZI, T.F. Manual de Hematologia – Propedêutica e Clínica. 4ª Ed. **Editora Guanabara Koogan**, 2006; p. 99 - 116

LUO HR, LOISON F. Constitutive neutrophil apoptosis: Mechanisms e regulation. **American Journal of Hematology** 2008; 83:288-95.

MAIANSKI NA, GEISSLER J, SRINIVASULA SM, ALNEMRI ES, ROOS D, KUIJPERS TW. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. **Cell Death and Differentiation** 2004; 11:143-53.

MAIANSKI NA, KUIJPERS TW, ROOS D. Apoptosis of neutrophils. **Acta Haematologica** 2004;111:56-66.

MARTIN C, BOISSON C, HACCOUN M, THOMACHOT L, MEGE JL. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. **Crit Care Med** 1997; 25:1813-9.

MIHALACHE, C. C. et al. Inflammation-associated autophagy-related programmed necrotic death of human neutrophils characterized by organelle fusion events. **J Immunol** 2011; 186: 6532-42.

MITRA, S. et al. Dorfman-Chanarin syndrome: a rare neutral lipid storage disease. **Indian J Pathol Microbiol** 2010; 53:799-801.

MORRISON CA et al. Increased apoptosis of peripheral blood neutrophils is associated with reduced incidence of infection in trauma patients with hemorrhagic shock. **Journal of Infection** 2013; 66:87-94

PEITZMAN, A. B. et al. Hemorrhagic shock. **Curr Probl Surg** 1995; 32:925-1002.

PROSKURYAKOV SY, KONOPLYANNIKOV AG, GABAI VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research** 2003; 283:1-16.

ROBBINS. Patologia Estrutural e Funcional. 6ª. Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000; p 1–26.

ROTSTEIN OD. Modeling the two-hit hypothesis for evaluating strategies to prevent organ injury after shock/resuscitation. **J Trauma** 2003; 54(Suppl):S203-6.

RYTER SW, KIM HP, HOETZEL A, PARK JW, NAKAHIRA K, WANG X, ET AL. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling** 2007; 9:49-89.

SHATNEY, C. H. et al. The natural leukocyte response to hemorrhagic shock. **Adv Shock Res** 1981; 5:79-88.

SHIMIZU S, EGUCHI Y, KAMIKE W, FUNAHASHI Y, MIGNON A, LACRONIQUE V, et al. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 1998; 95:1455-9.

TIETZ. Fundamentos de Química Clínica. 6ª ed., Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008; p. 671 – 90.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med** 2000; 342:1334-49.

WORONZOFF-DASHKOFF, K. K. The wright-giemsa stain. Secrets revealed. **Clin Lab Med** 2002; 2:15-23

WYLLIE AH, KERR JF, CURRIE AR. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology** 1980; 68:251-306.

YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2:32. Mayer B, Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis. **News in Physiology Sciences** 2003; 18:89-94.

YAMAZAKI Y, SAITO A, HASEGAWA K, TAKAHASHI H. Blood Lactate concentrations as predictors de outcome in serious hemorrhagic shock patients **Masui** 2006; 55:699-703

10. ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de ética – Hospital Risoleta Tolentino Neves

HOSPITAL
RISOLETA TOLENTINO NEVES



Núcleo de Ensino e Pesquisa

Belo Horizonte, 11 de Outubro 2011.

Processo Nº 30 /2011

Título do Projeto: IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DO CONDICIONAMENTO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ÓTICA EM PACIENTES POLITRAUMATIZADOS VÍTIMAS DE CHOQUE HEMORRÁGICO.

Pesquisador: João Batista Rezende Neto

O projeto se propõe a avaliar o eventual valor prognóstico das alterações morfológicas dos leucócitos polimorfonucleares, observadas através de microscopia ótica na fase aguda do choque hemorrágico, em pacientes politraumatizados.

Entende-se que o mérito da iniciativa é louvável e sua exequibilidade no HRTN é plena.

Não se identificam impedimentos éticos para a realização do estudo, embora seja desejável que o termo de consentimento livre esclarecido contemple a possibilidade de assinatura por substituo. Faz-se a previsão de que potenciais participantes encontrar-se-ão impedidos de consentir participação devido a condições clínicas graves.

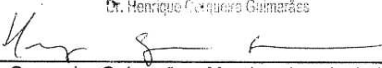
O ônus referente aos insumos e processamento das amostras de sangue estará a cargo dos pesquisadores.

Desta sorte, o parecer é favorável a realização do referido projeto nas dependências do HRTN.

00611363986

ESP. 5

Dr. Henrique Cerqueira Guimarães


Henrique Cerqueira Guimarães Membro do colegiado do NEPE

Hospital Risoleta Tolentino Neves
Rua das Gabirobas, 01 Vila Clóris CEP 31744-012
Belo Horizonte – MG Telefone: (31) 3459-3266 Fax: (31)3459-3229

ANEXO B Termo de Consentimento para Estudo:**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Este termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, em uma pesquisa intitulada “IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DO CONDICIONAMENTO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ÓTICA EM PACIENTES POLITRAUMATIZADOS COM CHOQUE HEMORRÁGICO”. Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento. Em caso de dúvida ou informações sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, João Baptista de Rezende Neto pelo telefone 8891-5731 ou 3409-9760. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Núcleo de Ensino e Pesquisa do Hospital Risoleta Tolentino Neves, no telefone 31-3459-3200 (Belo Horizonte).

Você está sendo convidado e sua participação não é obrigatória. A pesquisa não trará nenhuma despesa para você, ficando os custos sob a responsabilidade do pesquisador. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com o seu tratamento no hospital. É preciso entender a natureza de sua participação e dar o seu consentimento livre e esclarecido por escrito.

Este estudo tem como principal objetivo avaliar as alterações nas células sanguíneas de defesa, vistas através do exame de 2 gotas de sangue.

Para sua participação no estudo, serão obtidas 2 gotas do sangue que já será colhido como parte de seu atendimento neste hospital. Esse processo irá se repetir sete vezes, sempre coincidindo com os exames de rotina.

O presente estudo não acrescenta risco adicional à sua saúde. Apenas haverá um incômodo referente às punções, porém elas seriam realizadas (como parte de seu atendimento no serviço), mesmo se você não estivesse participando deste estudo.

Nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira será feito pela sua participação. Está assegurado seu direito de solicitar indenização em casos de danos decorrentes da pesquisa. Asseguramos que todas as informações prestadas pelo (a) senhor (a) são sigilosas e serão utilizadas somente para esta pesquisa, não sendo armazenadas para estudos futuros. A divulgação das informações ficará sob sigilo e em conjunto com as respostas de um grupo de pessoas. Ao assinar este consentimento você estará autorizando, também, a inspeção dos seus registros hospitalares. O documento apresenta-se em duas vias, sendo uma sua e outra do pesquisador.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____,
RG/CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo, “IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DO CONDICIONAMENTO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ÓTICA EM PACIENTES POLITRAUMATIZADOS COM CHOQUE HEMORRÁGICO” sob a responsabilidade do Professor Dr. João Baptista de Rezende Neto, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador responsável sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento.

Local: _____

Data: /

Nome e assinatura do sujeito ou responsável:

Nome e assinatura do Pesquisador responsável:

ANEXO C – Dados clínicos dos pacientes do grupo choque envolvidos no estudo

Paciente 1	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,08	0,01	0,02	0,16	0,1	0,04	0,06
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	3,188	0,891	1,989	18,557	9,13	2,722	7,225
Número de vacúolo no núcleo	0	0	0	0,01	0	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0	0	1,382	0	0	0
Frequência cardíaca (bpm)	90	93	89	100	86	81	94
Pressão arterial média (PIA)	78	78	72	74	72	72	74
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0,6	sem dados	sem dados	0,32	0,32	0,6	0,44
Cristalóide	STP70ml/h	STP70ml/h	STP70ml/h + 500mlSF	STP 70ml/h	STP70ml/h	STP90ml/h	STP90ml/h
Concentrado de hemácias	600ml	0	0	0	0	0	0
Plasma fresco congelado	0	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 2	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,31	0,87	0,8	0,69	0,08	0,51	0,01
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	62,978	119,835	115,018	51,95	19,925	79,99	21,565
Número de vacúolo no núcleo	0,01	0	0	0	0,01	0,01	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0,659	0	0	0	0,775	1,317	0
Frequência cardíaca (bpm)	110	108	95	95	118	92	98
Pressão arterial média	75	74	70	86	98	82	90
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0,8	1,6	0,32	0	0	0	0
Cristalóide	RL500mL	RL500mL	STP60ml/h	STP60ml/h	STP60ml/h	STP60ml/h	STP80ml/h
Concentrado de hemácias	900ml	0	600mL	0	0	0	0
Plasma fresco congelado	600ml	0	400mL	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 3	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,05	0,07	0,13	0,13	0,23	0,04	0,01
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	7,691	24,626	31,173	26,918	33,239	11,751	2,195
Número de vacúolo no núcleo	0	0	0,01	0,01	0	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0	0,646	0,981	0	0	0
Frequência cardíaca (bpm)	130	180	134	130	113	114	91
Pressão arterial média	62	70	62	73	75	90	104
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não
Dose de Noradrenalina (mg/h)	3,2	4,6	3,2	4,6	4,8	1,2	0,16
Cristalóide	0	0	0	0	0	0	0
Concentrado de hemácias	1200 mL	600 mL	0	0	300 mL	0	600 mL
Plasma fresco congelado	800	0	0	0	800	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 4	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,85	0,68	0,91	0,37	0,67	1,11	0,24
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	90,745	90,535	131,767	38,384	129,252	70,222	22,731
Número de vacúolo no núcleo	0,01	0,02	0,02	0	0,05	0,03	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0,245	2,169	0,659	0	3,9	0,801	0
Frequência cardíaca (bpm)	150	160	169	115	120	120	136
Pressão arterial média	95	sem dados	86	84	97	89	89
Ventilação mecânica	sim	sim	não	não	não	não	não
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0	0	0	0	0	0	0
Cristalóide	0	0	0	0	0	0	0
Concentrado de hemácias	0	0	0	0	0	0	0
Plasma fresco congelado	0	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 5	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,04	0,01	0,06	0,08	0,2	0,09	0,32
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	8,394	0,775	14,644	9,065	30,181	14,489	42,843
Número de vacúolo no núcleo	0	0	0	0	0,04	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0	0	0	3,396	0	0
Frequência cardíaca (bpm)	124	96	102	88	100	98	88
Pressão arterial média	89	89	89	89	112	103	89
Ventilação mecânica	não	não	não	não	não	não	não
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0,2	0	0	0	0	0	0
Cristalóide	1000ml + 180ml/h	60ml/h	120ml/h	120ml/h	120ml/h	120ml/h	240ml/h
Concentrado de hemácias	600ml	0	600ml	600ml	600ml	0	0
Plasma fresco congelado	0	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 6	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	1,54	0,82	1,32	0,41	0,66	2,86	1,37
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	86,384	105,228	85,666	55,333	82,85	179,223	246,978
Número de vacúolo no núcleo	0,06	0	0,07	0,02	0,04	0,06	0,07
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	2,376	0	2,751	0,775	4,946	1,937	3,796
Frequência cardíaca (bpm)	95	136	100	103	100	116	102
Pressão arterial média	106	74	80	89	sem dados	100	77
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0,4	0,4	0,12	0,12	0,2	0,2	0
Cristalóide	5000ml	2000ml	0	0	60ml/h	500ml + 60ml/h	0
Concentrado de hemácias	0	600ml	0	0	0	0	0
Plasma fresco congelado	400ml	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 7	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,01	0,04	0	0	0	0,11	0,02
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	0,839	2,324	0	0	0	7,825	0,736
Número de vacúolo no núcleo	0	0	0	0	0	0,01	0,01
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0	0	0	0	0,22	0,232
Frequência cardíaca (bpm)	120	92		90	86	88	90
Pressão arterial média	114	sem dados	80	114	89	96	92
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	Sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0	0	0	0	0	0	0
Cristalóide	STP60ml/h	RL3500mL+S F1000	STP60ml/h	STP60ml/h	STP60ml/h	STP60ml/h	STP60ml/h
Concentrado de hemácias	600mL	0	0	0	0	0	0
Plasma fresco congelado		600mL	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)		400mL	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado		8frascos	0	0	0	0	0

Paciente 8	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	1,04	1,08	1,45	0,47	0,28	0,29	0,46
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	188,093	124,38	228,786	73,475	32,792	49,657	42,092
Número de vacúolo no núcleo	0,12	0,07	0,06	0,05	0,01	0,04	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	8,871	4,997	7,241	4,735	0,646	2,144	0
Frequência cardíaca (bpm)	120	79	86		116	96	110
Pressão arterial média	89	70	70	sem dados	66	66	70
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)		sem dados	sem dados	sem dados	sem dados	sem dados	sem dados
Cristalóide	3500 mL	0	0	0	0	0	0
Concentrado de hemácias	0	0	0	0	0	0	600 mL
Plasma fresco congelado	0	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transfusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 9	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	*	2,66	1,8	2,09	1,68	0,73	0,95
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	*	163,225	154,859	238,15	194,81	75,993	84,159
Número de vacúolo no núcleo	*	0,06	0,56	0,08	0,01	0,01	0,72
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	*	3,422	0,297	3,396	0,6	0,697	0,684
Frequência cardíaca (bpm)	140	156	154	144	120	100	114
Pressão arterial média	87	60	sem dados	sem dados	74	72	103
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	2,4	1,6	1,6	1,6	1,12	0,24	0
Cristalóide	0	0	120mL/h	120mL/h	120mL/h	60mL/h	60mL/h
Concentrado de hemácias	0	0	0	0	0	0	0
Plasma fresco congelado	0	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

*Lâmina confeccionada não permitiu a realização da morfometria dos vacúolos.

Paciente 10	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,05	0,06	0,02	0,22	0,22	0,18	0
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	6,289	8,536	2,002	21,165	14,521	16,125	0
Número de vacúolo no núcleo	0	0	0	0,01	0	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0	0	0,542	0	0	0
Frequência cardíaca (bpm)	102	111	100	111	114	115	115
Pressão arterial média	100	68	sem dados	sem dados	90	80	70
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0,4	1,28	1,28	1,12	1,6	0,12	0,04
Cristalóide	70ml/h	70ml/h	70ml/h	70ml/h	70ml/h	10ml/h	10ml/h
Concentrado de hemácias	0	600ml	0	0	0	0	0
Plasma fresco congelado	0	400ml	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 11	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	*	0,12	0,1	0,09	0,14	0	0,09
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	*	6,418	9,233	10,718	21,023	0	10,305
Número de vacúolo no núcleo	*	0	0	0	0,01	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	*	0	0	0	0,633	0	0
Frequência cardíaca (bpm)	120	100	102	78	75	102	76
Pressão arterial média	70	sem dados	89	65	89	89	89
Ventilação mecânica	sim	sim	não	não	não	não	não
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0,28	0,4	0,16	0	0	0	0
Cristalóide	0	STP80ml/h	STP80ml/h	STP60ml/h	STP80ml/h	0	0
Concentrado de hemácias	600ml	0	0	300ml	0	0	0
Plasma fresco congelado	400ml	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transfusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

*Lâmina confeccionada não permitiu a realização da morfometria dos vacúolos.

Paciente 12	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,39	1,01	1,26	0,55	0,88	0,23	0,82
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	74,205	132,491	118,984	63,545	93,388	15,096	84,926
Número de vacúolo no núcleo	0,02	0,02	0,01	0,01	0,04	0	0,03
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	3,035	4,197	1,459	0,349	4,158	0	1,227
Frequência cardíaca (bpm)	145	101	108	100	98	100	98
Pressão arterial média	65	84	77	sem dados	sem dados	sem dados	103
Ventilação mecânica	não	não	não	não	não	não	não
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0	0	0	0	0	0	0
Cristalóide	SF3000ML	0	0	STP70ml/h	STP70ml/h	STP70ml/h	STP90ml/h
Concentrado de hemácias	0	0	0	0	0	0	0
Plasma fresco congelado	0	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 13	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,18	0,58	0,26	0,13	0,14	0,22	0,76
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	0,18	34,582	13,727	7,683	6,327	9,711	65,483
Número de vacúolo no núcleo	0,18	0,07	0,02	0	0	0	0,01
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0,18	2,027	0,788	0	0	0	0,594
Frequência cardíaca (bpm)	110	133	100	92	125	106	84
Pressão arterial média	88	67	74	106	90	83	104
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	não	não	não	não
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0	0	0	0	0	0	0
Cristalóide	2000mL	STP60ml/h + SF10ml/h	STP60ml/h + SF10ml/h	STP60ml/h + SF10ml/h	STP60ml/h + SF10ml/h	STP60ml/h + SF10ml/h	STP60ml/h + SF10ml/h
Concentrado de hemácias	0	0	0	0	0	0	300mL
Plasma fresco congelado	0	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 14	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,06	0,12	0,22	0,02	0,33	0,02	0,03
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	5,217	10,537	29,496	2,027	68,182	4,597	1,343
Número de vacúolo no núcleo	0	0,01	0,01	0	0,01	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0,31	0,801	0	0,633	0	0
Frequência cardíaca (bpm)	101	100	88	102	100	90	158
Pressão arterial média	65	sem dados	sem dados	sem dados	87	sem dados	76
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	Sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0,24	0,48	0,32	0,16	0	0	0
Cristalóide	3000ML	STP 90ML/H + SF500ML	STP 90ML/H + SF10ML/H	STP 90ML/H + SF500ML	STP 60ML/H + SF10ML/H	ATP 60ML/H	300ML/H
Concentrado de hemácias	0	0	300ML	0	0	300ML	300ML
Plasma fresco congelado	0	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 15	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,67	0,72	0,26	0,56	1,44	1,1	1,36
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	56,446	70,289	30,165	67,794	206,248	243,711	319,2
Número de vacúolo no núcleo	0,1	0	0,02	0,01	0,14	0,19	0,18
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	11,983	0	1,511	1,304	22,185	52,815	33,328
Frequência cardíaca (bpm)	156	130	120	110	122	101	130
Pressão arterial média	88	89	89	89	69	89	89
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	5,6	4,6	2,4	2,4	1,92	0,56	0,6
Cristalóide	10ml/h	3000ml	60ml/h	90ml/h	90ml/h	2000ml	60ml/h
Concentrado de hemácias	0	300ml	0	600ml	0	0	0
Plasma fresco congelado	0	6bolsas	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0		0	0
CRIO- precipitado	0	10 bolsas	0	0	0	0	0

Paciente 16	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,06	0,86	0,35	0,73	0,16	0,14	1,18
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	10,227	95,833	12,408	42,794	16,852	6,314	67,033
Número de vacúolo no núcleo	0	0,02	0,03	0,49	0,26	0	0,15
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	1,033	0,517	15,754	8,742	0	5,32
Frequência cardíaca (bpm)	130	140	148	140	124	97	100
Pressão arterial média	70	60	60	71	74	69	74
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	Sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0,6	0,4	0,4	0,48	1	0,48	0
Cristalóide	STP60ml/h	STP60ml/h	STP60ml/h	STP60ml/h	STP60ml/h + RL500ml	STP60ml/h	STP80ml/h
Concentrado de hemácias	900ml	0	0	0	300ml	0	0
Plasma fresco congelado	600ml	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	5u	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 17	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,37	0,12	0,38	0,08	1,14	0,3	0,07
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	74,677	21,294	73,032	11,17	167,063	53,619	8,174
Número de vacúolo no núcleo	0,04	0	0,01	0	0,03	0,04	0,02
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	6,061	0	0,736	0	4,985	4,171	5,785
Frequência cardíaca (bpm)	114	119	130	112	115	111	115
Pressão arterial média	89	70	98	100	80	80	80
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	1,6	1,76	1,64	1,44	1,24	0,24	0,04
Cristalóide	STP60ml/h	STP60ml/h	STP60ml/h+S F500ml	9999	STP60ml/h	STP60ml/h	STP60ml/h+ SF10ml/h
Concentrado de hemácias	0	0	0	0	0	0	0
Plasma fresco congelado	0	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 18	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,86	0,17	0,23	*	0,21	0,57	0,68
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	88,262	13,748	8,417	*	11,402	28,302	47,095
Número de vacúolo no núcleo	0,11	0,25	0,54	*	0,59	0,03	0,43
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	6,857	9,039	0,736	*	19,423	1,02	15,69
Frequência cardíaca (bpm)	140	130	130	120	108	120	138
Pressão arterial média	60	60	70	74	60	85	93
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	Sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	1,6	1,4	0	0	0	0	0
Cristalóide	STP60ml/h + RL100ml/h	STP100ml/h	STP100ml/h	STP120ml/h + SF10ml/h	STP120ml/h + SF10ml/h	STP120ml/h + SF10ml/h	STP100ml/h
Concentrado de hemácias	600mL	900ml	0	0	0	600mL	0
Plasma fresco congelado	2bolsas	5bolsas	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

* Amostra não coletada

Paciente 19	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	1,98	2,26	2,38	1,47	3,05	2,37	1,12
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	291,451	266,655	330,711	272,869	449,38	248,355	144,085
Número de vacúolo no núcleo	0,09	0,36	0,2	0,22	0,22	0,17	0,16
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	11,015	12,85	21,772	29,339	23,321	14,501	13,533
Frequencia cardíaca (bpm)	140	140	144	150	153	134	121
Pressão arterial média	55	72	70	80	87	70	70
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	Sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	2,2	2	sem dados	sem dados	4,8	2,8	5,44
Cristalóide	16frascos	sem dados	sem dados	sem dados	sem dados	STP60ml/h	sem dados
Concentrado de hemácias	4bolsas	6bolsas	8bolsas	0	0	3bolsas	0
Plasma fresco congelado	4bolsas	0	4bolsas	0	8bolsas	5bolsas	0
Plaquetas (transusão)	4bolsas	0	0	0	0	8bolsas	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

Paciente 20	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,57	0,06	0,81	0,37	*	0,14	0,39
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	69,891	7,154	93,702	37,216	*	10,163	45,235
Número de vacúolo no núcleo	0,02	0	0,02	0	*	0	0,01
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0,762	0	1,86	0	*	0	0,504
Frequência cardíaca (bpm)	132	107	107	107	110	97	97
Pressão arterial média	95	78	70	122	95	102	98
Ventilação mecânica	sim	sim	sim	sim	sim	sim	Sim
Dose de Noradrenalina (mg/h)	0,4	0,4	0	0	0	0	0
Cristalóide	RL1500mL + SF200mL	sem dados	sem dados	sem dados	4500mL	1500mL	1500mL
Concentrado de hemácias	600ml	0	300mL	0	0	0	0
Plasma fresco congelado	600ml	0	0	0	0	0	0
Plaquetas (transusão)	0	0	0	0	0	0	0
CRIO- precipitado	0	0	0	0	0	0	0

*Lâmina confeccionada não permitiu a realização da morfometria dos vacúolos.

ANEXO D – Dados laboratoriais dos pacientes do grupo choque envolvidos no estudo

Paciente 1	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,08	0,01	0,02	0,16	0,1	0,04	0,06
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	3,188	0,891	1,989	18,557	9,13	2,722	7,225
Número de vacúolo no núcleo	0	0	0	0,01	0	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0	0	1,382	0	0	0
Hemoglobina (g/L)		7.8		8.0		7.7	8.4
Global de leucócitos (mm^3)				9.060		8.430	10.920
% Neutrófilos bastonetes				15		19	7
% Neutrófilos segmentados				71		68	73
Contagem de plaquetas				266.000		318.000	372.000
Tempo de Trotombina	16.9/77%						
Tempo de tromboplastina parcial ativada	31						
Relação paciente controle (PTT)	1.19						
Relação normatizada internacional(RNI)	1.20						
PH arterial	7.396		7.395		7.434	7.470	
Lactato (mmol/L)				0.8		0.9	0.9
Sódio (mmol/L)				132		132	133
Potássio (mmol/L)				3.4		3.6	3.8
Cloretos (mmol/L)							

Paciente 2	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,31	0,87	0,8	0,69	0,08	0,51	0,01
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	62,978	119,835	115,018	51,95	19,925	79,99	21,565
Número de vacúolo no núcleo	0,01	0	0	0	0,01	0,01	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0,659	0	0	0	0,775	1,317	0
Hemoglobina (g/L)	5.4	11.4		10.3	11.0	9.2	8.2
Global de leucócitos (mm^3)	7.440	11.210		15.520	11.990	8.420	9.110
% Neutrófilos bastonetes	7	0		21	10	16	6
% Neutrófilos segmentados	72	75.9		66	84	67	74
Contagem de plaquetas	156.000	156.000		174.000	140.000	145.000	146.000
Tempo de Protombina/atividade	36.9/ 27%	22.6/48%		20.1/58%	18.2/68%	17.5/73%	15.1/93%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	> 120	38		37		47	37
Relação paciente controle (PTT)		1.31		1.28	1.62	1.28	1.28
Relação normatizada internacional(RNI)	2.98	1.68		1.46	1.30	1.25	1.05
PH arterial	7.160	7.154		7.175	7.232	7.301	7.374
Lactato (mmol/L)		2.2	2.1				
Sódio (mmol/L)	139			139	140	143	144
Potássio (mmol/L)	5.7			6.0	5.0	4.6	3.6
Cloretos (mmol/L)	121			118	118	118	117

Paciente 3	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,05	0,07	0,13	0,13	0,23	0,04	0,01
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	7,691	24,626	31,173	26,918	33,239	11,751	2,195
Número de vacúolo no núcleo	0	0	0,01	0,01	0	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0	0,646	0,981	0	0	0
Hemoglobina (g/L)	7.4			8.3	8.1	6.9	7.9
Global de leucócitos (mm^3)	4.450				8.650	8930	9.780
% Neutrófilos bastonetes	0				0	0	13
% Neutrófilos segmentados	61.5				90	91.5	71
Contagem de plaquetas	85.000			78.000	75.000	70.000	96.000
Tempo de Protombina/atividade	44.5/18%				20.9/49%	17.1/64%	15.9/78%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	Incoagulável				39	40	33
Relação paciente controle (PTT)	Incoagulável				1.5	1.54	1.27
Relação normatizada internacional(RNI)	3.75				1.57	1.30	1.15
PH arterial	7.127	7.164	7.319	7.324	7.245	7.410	7.451
Lactato (mmol/L)					6.3	2.1	1.0
Sódio (mmol/L)					140		
Potássio (mmol/L)				4.2	4.8	4.0	3.7
Cloretos (mmol/L)					114	107	106

Paciente 4	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,85	0,68	0,91	0,37	0,67	1,11	0,24
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	90,745	90,535	131,767	38,384	129,252	70,222	22,731
Número de vacúolo no núcleo	0,01	0,02	0,02	0	0,05	0,03	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0,245	2,169	0,659	0	3,9	0,801	0
Hemoglobina (g/L)	14.4		12.3			9.6	9.3
Global de leucócitos (mm^3)			16.030			14.070	13.520
% Neutrófilos bastonetes	0			8	12	8	12
% Neutrófilos segmentados			92			87	80
Contagem de plaquetas			103.000			88.000	104.000
Tempo de Protombina/atividade	19.5/ 61%		24.3/44%			24.8/43%	
Tempo de tromboplastina parcial ativada	39		48			51	
Relação paciente controle (PTT)	1.26		1.55			1.65	
Relação normatizada internacional(RNI)	1.41		1.83			1,87	
PH arterial	7.272	7.236	7.279			7.368	
Lactato (mmol/L)	3.2		2.0			1.3	
Sódio (mmol/L)	138					137	137
Potássio (mmol/L)	3.9		4.2			3.5	3.2
Cloretos (mmol/L)						112	

Paciente 5	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,04	0,01	0,06	0,08	0,2	0,09	0,32
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	8,394	0,775	14,644	9,065	30,181	14,489	42,843
Número de vacúolo no núcleo	0	0	0	0	0,04	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0	0	0	3,396	0	0
Hemoglobina (g/L)	8.3			6.4	8.6		8.7
Global de leucócitos (mm^3)	14.520			10.100	8.800		6.580
% Neutrófilos bastonetes	0			0	0		0
% Neutrófilos segmentados	86.8			85.2	88.5		70.6
Contagem de plaquetas	110.000			107.000	137.000		169.000
Tempo de Protombina/atividade	29.4/36%	18.5/66%					
Tempo de tromboplastina parcial ativada	> 120	48	> 120		70	57	
Relação paciente controle (PTT)		1.66			2.41	1.97	
Relação normatizada internacional(RNI)	2.29	1.33					
PH arterial	7.260	7.281	7.364		7.403	7.461	
Lactato (mmol/L)	1.5	1.2		0.8	1.0		
Sódio (mmol/L)	136			134	133		132
Potássio (mmol/L)	4.1			3.6	3.7		3.6
Cloretos (mmol/L)	110			104	102		

Paciente 6	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	1,54	0,82	1,32	0,41	0,66	2,86	1,37
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	86,384	105,228	85,666	55,333	82,85	179,223	246,978
Número de vacúolo no núcleo	0,06	0	0,07	0,02	0,04	0,06	0,07
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	2,376	0	2,751	0,775	4,946	1,937	3,796
Hemoglobina (g/L)	6.1	10.5	7.6	9.1	8.9	10.1	8.0
Global de leucócitos (mm^3)		9.110		8.220	12.900	17.420	18.770
% Neutrófilos bastonetes	0		14	37	21	9	
% Neutrófilos segmentados	79.3		75	38	63	69	
Contagem de plaquetas		85.000	62.000	86.000	87.000	135.000	120.000
Tempo de Protombina/atividade	37.5/27%	22.4/49%	19.8/59%	21.1/53%	20.8/55%	17.7/71%	
Tempo de tromboplastina parcial ativada	124	43	41	42	46	43	
Relação paciente controle (PTT)	4.00	1.39	1.32	1.35	1.48	1.39	
Relação normatizada internacional(RNI)	3.04	1.66	1.44	1.55	1.52	1.26	
PH arterial	7.037		7.340	7.354	7.354	7.319	7.417
Lactato (mmol/L)	3.9	2.0	2.8	2.4	2.7	2.0	1.1
Sódio (mmol/L)	139	137.0	137		133	132	136
Potássio (mmol/L)	3.3	4.7	5.1		5.6	5.6	4.2
Cloretos (mmol/L)		116.0	112		109	110	104

Paciente 7	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,01	0,04	0	0	0	0,11	0,02
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	0,839	2,324	0	0	0	7,825	0,736
Número de vacúolo no núcleo	0	0	0	0	0	0,01	0,01
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0	0	0	0	0,22	0,232
Hemoglobina (g/L)	7.5		9.6	9.4	9.2		8.2
Global de leucócitos (mm^3)	6.650		9.320	10.110	12.770		10.270
% Neutrófilos bastonetes	0		0	0	0		0
% Neutrófilos segmentados	82.9		81.6	80.7	78.9		78.7
Contagem de plaquetas	97.000		89.000	95.000	114.000		117.000
Tempo de Protombina/atividade	22.5/47%		18.2/65%	15.3/87%			15.0/90%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	42		37	38			37
Relação paciente controle (PTT)	1.45		1.28	1.31			1.28
Relação normatizada internacional(RNI)	1.72		1.34	1.10			1.07
PH arterial	7.436		7.444	7.531	7.460		7.437
Lactato (mmol/L)	1.3		0.8	1.0	0.9		
Sódio (mmol/L)	136			136	133		133
Potássio (mmol/L)	3.7			3.3	3.8		3.8
Cloretos (mmol/L)	107			104	103		103

Paciente 8	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	1,04	1,08	1,45	0,47	0,28	0,29	0,46
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	188,093	124,38	228,786	73,475	32,792	49,657	42,092
Número de vacúolo no núcleo	0,12	0,07	0,06	0,05	0,01	0,04	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	8,871	4,997	7,241	4,735	0,646	2,144	0
Hemoglobina (g/L)	9.4	7.9	7.0	6.0	7.5		7.8
Global de leucócitos (mm^3)	1.260		4.770		5.710		8.870
% Neutrófilos bastonetes	0		0		0		0
% Neutrófilos segmentados	68.3		87		83.3		83.6
Contagem de plaquetas	75.000		88.000		80.000		88.000
Tempo de Protombina/atividade	18.8		20.2		18.6		
Tempo de tromboplastina parcial ativada	43		46		40		
Relação paciente controle (PTT)	1.39		1.48		1.29		
Relação normatizada internacional(RNI)	1.36		1.47		1.34		
PH arterial	7.349	7.354	7.429		7.475		7.296
Lactato (mmol/L)	3.8	2.6	1.1		1.1		1.6
Sódio (mmol/L)	135	134.0	134		133		137
Potássio (mmol/L)	3.6	3.8	3.2		3.1		3.5
Cloretos (mmol/L)	108	108	106		110		111

Paciente 9	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	*	2,66	1,8	2,09	1,68	0,73	0,95
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	*	163,225	154,859	238,15	194,81	75,993	84,159
Número de vacúolo no núcleo	*	0,06	0,56	0,08	0,01	0,01	0,72
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	*	3,422	0,297	3,396	0,6	0,697	0,684
Hemoglobina (g/L)	12.8	10.7		11.4		7.1	7.3
Global de leucócitos (mm^3)	5.440			16.290		7.110	6.920
% Neutrófilos bastonetes	0			13		14	0
% Neutrófilos segmentados	59.1			69		76	84.4
Contagem de plaquetas	261.000	163.000		170.000		81.000	60.000
Tempo de Protombina/atividade	20.2/57%		26.2/41%	23.1/47%		19.3/62%	15.1/93%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	33		49	51		64	36
Relação paciente controle (PTT)	1.06		1.58	1.65		2.06	1.16
Relação normatizada internacional(RNI)	1.47		2.00	1.72		1.40	1.05
PH arterial	7.144	7.246	7.198	7.143		7.460	7.399
Lactato (mmol/L)	4.3	3.5	3.8	2.4		3.4	1.3
Sódio (mmol/L)	138	137.0	136	135		132	130
Potássio (mmol/L)	4.6	6.0	5.9	6.9		4.2	3.6
Cloretos (mmol/L)	120		116	113		98	98

*Lâmina confeccionada não permitiu a realização da morfometria dos vacúolos.

Paciente 10	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,05	0,06	0,02	0,22	0,22	0,18	0
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	6,289	8,536	2,002	21,165	14,521	16,125	0
Número de vacúolo no núcleo	0	0	0	0,01	0	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0	0	0,542	0	0	0
Hemoglobina (g/L)	10.5			8.9		6.4	7.1
Global de leucócitos (mm^3)				12.190		7.390	6.790
% Neutrófilos bastonetes				8		0	0
% Neutrófilos segmentados				63		79.7	74.4
Contagem de plaquetas				120.000		82.000	103.000
Tempo de Protombina/atividade				19.8/59%		17.2/75%	
Tempo de tromboplastina parcial ativada				41		41	
Relação paciente controle (PTT)				1.32		1.32	
Relação normatizada internacional(RNI)				1.44		1.22	
PH arterial	7.261	7.253		7.291		7.434	7.449
Lactato (mmol/L)	1.4	1.4		0.8			
Sódio (mmol/L)	138	139.0		137		137	139
Potássio (mmol/L)	5.0	4.5		4.1		3.3	3.4
Cloretos (mmol/L)	116	116.0		113		110	111

Paciente 11	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	*	0,12	0,1	0,09	0,14	0	0,09
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	*	6,418	9,233	10,718	21,023	0	10,305
Número de vacúolo no núcleo	*	0	0	0	0,01	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	*	0	0	0	0,633	0	0
Hemoglobina (g/L)	6.8			6.5		8.5	9.0
Global de leucócitos (mm^3)	11.420			10.030		9.970	9.180
% Neutrófilos bastonetes	3			2		0	0
% Neutrófilos segmentados	79			82		84.7	77.4
Contagem de plaquetas	87.000			99.000		175.000	241.000
Tempo de Protombina/atividade				16.0/84%			
Tempo de tromboplastina parcial ativada				36			
Relação paciente controle (PTT)				1.24			
Relação normalizada internacional(RNI)				1.12			
PH arterial	7.470			7.398			
Lactato (mmol/L)	1.2			0.8			
Sódio (mmol/L)	130			133			135
Potássio (mmol/L)	3.7			3.6			3.6
Cloretos (mmol/L)	105			105			103

*Lâmina confeccionada não permitiu a realização da morfometria dos vacúolos.

Paciente 12	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,39	1,01	1,26	0,55	0,88	0,23	0,82
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	74,205	132,491	118,984	63,545	93,388	15,096	84,926
Número de vacúolo no núcleo	0,02	0,02	0,01	0,01	0,04	0	0,03
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	3,035	4,197	1,459	0,349	4,158	0	1,227
Hemoglobina (g/L)	11.0		8.5		8.0	6.7	
Global de leucócitos (mm^3)	5.840		14.460		17.160	14.780	
% Neutrófilos bastonetes	0		21		40	16	
% Neutrófilos segmentados	77.8		63		48	71	
Contagem de plaquetas	137.000		145.000		156.000	173.000	
Tempo de Protombina/atividade	17.4/73%		22.2/49%		20.9/54%	19.3/62%	
Tempo de tromboplastina parcial ativada	34		42		43	44	
Relação paciente controle (PTT)	1.17		1.45		1.48	1.52	
Relação normatizada internacional(RNI)	1.24		1.65		1.53	1.40	
PH arterial	7.298		7.376		7.384	7.425	
Lactato (mmol/L)			2.1		1.7		
Sódio (mmol/L)	134		130		130	131	
Potássio (mmol/L)	6.2		4.2		4.2	3.8	
Cloretos (mmol/L)	113		107		105	104	

Paciente 13	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,18	0,58	0,26	0,13	0,14	0,22	0,76
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	0,18	34,582	13,727	7,683	6,327	9,711	65,483
Número de vacúolo no núcleo	0,18	0,07	0,02	0	0	0	0,01
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0,18	2,027	0,788	0	0	0	0,594
Hemoglobina (g/L)	9.8	8.9		7.0		6.8	6.5
Global de leucócitos (mm^3)	30.200	24.120		18.540		9.170	6.090
% Neutrófilos bastonetes	0	5		7		0	0
% Neutrófilos segmentados	85.1	70		66		65.2	63.3
Contagem de plaquetas	203.000	206.000		161.000		122.000	173.000
Tempo de Protombina/atividade	15.9/85%	14.7/98%		16.7/78%		14.6/99%	14.5/100%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	39			33		32	31
Relação paciente controle (PTT)	1.26			1.06		1.03	1.0
Relação normatizada internacional(RNI)	1.11	1.02		1.18		1.01	1.0
PH arterial	7.274	7.304		7.275		7.417	7.413
Lactato (mmol/L)				2.3		1.0	1.2
Sódio (mmol/L)		136.0		137		132	134
Potássio (mmol/L)		4.6		5.0		3.8	3.5
Cloretos (mmol/L)		109.0		109		105	107

Paciente 14	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,06	0,12	0,22	0,02	0,33	0,02	0,03
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	5,217	10,537	29,496	2,027	68,182	4,597	1,343
Número de vacúolo no núcleo	0	0,01	0,01	0	0,01	0	0
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	0,31	0,801	0	0,633	0	0
Hemoglobina (g/L)		7.6	6.6	7.7		6.3	7.6
Global de leucócitos (mm^3)		10.480	9.030			6.010	8.760
% Neutrófilos bastonetes		0	0			0	0
% Neutrófilos segmentados		70.2	69			66.3	74.2
Contagem de plaquetas		117.000	95.000			86.000	88.000
Tempo de Protombina/atividade		27.4/39%	23.1/47%			17.2/75%	17.3/74%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	43	47	45			38	34
Relação paciente controle (PTT)	1.48	1.62	1.55			1.31	1.17
Relação normatizada internacional(RNI)		2.11	1.72			1.22	1.23
PH arterial	7.406	7.120	7.381	7.347		7.369	
Lactato (mmol/L)	1.3	1.2	1.3	1.1		1.1	
Sódio (mmol/L)	133		131			132	
Potássio (mmol/L)	4.3	134.0	4.3	4.4		4.2	
Cloretos (mmol/L)		108	107			104	

Paciente 15	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,67	0,72	0,26	0,56	1,44	1,1	1,36
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	56,446	70,289	30,165	67,794	206,248	243,711	319,2
Número de vacúolo no núcleo	0,1	0	0,02	0,01	0,14	0,19	0,18
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	11,983	0	1,511	1,304	22,185	52,815	33,328
Hemoglobina (g/L)	7.5	4.3	8.0	12.8	12.7	13	12.8
Global de leucócitos (mm^3)	8.070	5.750	5.760	8.030		10.400	6.300
% Neutrófilos bastonetes	0	0	29	31		22	30
% Neutrófilos segmentados	72	76.5	58	51		57	49
Contagem de plaquetas	160.000	79.000	41.000	111.000		41.000	38.000
Tempo de Protombina/atividade	30.1/35%	35.2/29%	30.9/34%			33.5/31%	26.2/41%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	46	46	45			75	42
Relação paciente controle (PTT)	1.48	1.48	1.45			2.42	1.35
Relação normatizada internacional(RNI)	2.35	2.82	2.42			2.66	2.00
PH arterial	7.144	7.027	7.218	7.234	7.232	7.360	7.490
Lactato (mmol/L)	10.5		7.9	6.6	5.6	3.4	4.0
Sódio (mmol/L)	143.0	139	137	137	137	131	
Potássio (mmol/L)	4.9	4.9	5.1	4.4	3.6	3.9	
Cloretos (mmol/L)	118.0		116	119	112	111	

Paciente 16	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,06	0,86	0,35	0,73	0,16	0,14	1,18
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	10,227	95,833	12,408	42,794	16,852	6,314	67,033
Número de vacúolo no núcleo	0	0,02	0,03	0,49	0,26	0	0,15
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0	1,033	0,517	15,754	8,742	0	5,32
Hemoglobina (g/L)	9.5	8.8	8.4		8.8	8.3	7.1
Global de leucócitos (mm^3)		5.330			12.500	11.220	8.730
% Neutrófilos bastonetes		0			7	0	0
% Neutrófilos segmentados		85.2			79	84.3	82.1
Contagem de plaquetas		134.000			131.000	104.000	83.000
Tempo de Protombina/atividade	28.2	24.9/42%			21.5/50%	19.4/59%	13.8/92%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	60	39			39	38	33
Relação paciente controle (PTT)	2.07	1.34			1.34	1.31	1.14
Relação normatizada internacional(RNI)	2.24	1.93			1.63	1.45	1.06
PH arterial	7.035	7.331	7.367		7.312	7.397	7.431
Lactato (mmol/L)		2.6			4.0	2.2	1.3
Sódio (mmol/L)		147.0				135	133
Potássio (mmol/L)		3.7			4.7	4.3	3.9
Cloretos (mmol/L)		118.0			116	111	109

Paciente 17	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,37	0,12	0,38	0,08	1,14	0,3	0,07
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	74,677	21,294	73,032	11,17	167,063	53,619	8,174
Número de vacúolo no núcleo	0,04	0	0,01	0	0,03	0,04	0,02
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	6,061	0	0,736	0	4,985	4,171	5,785
Hemoglobina (g/L)	13.1		12.5		9.6	8.3	7.2
Global de leucócitos (mm^3)	18.400		24.080		18.180	14.620	13.130
% Neutrófilos bastonetes	33		32		12	6	0
% Neutrófilos segmentados	44		61		70	81	76
Contagem de plaquetas	238.000		221.000		199.000	172.000	190.000
Tempo de Protombina/atividade	18.3/64%		20.3/55%		19.3/59%	16.7/75%	15.4/86%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	31		35		37	35	34
Relação paciente controle (PTT)	1.07		1.21		1.28	1.21	1.17
Relação normatizada internacional(RNI)	1.35		1.53		1.44	1.22	1.11
PH arterial	7.430	7.332	7.265		7.352	7.353	7.342
Lactato (mmol/L)	4.7		4.7		2.2	1.4	0.8
Sódio (mmol/L)	142		141		140	138	136
Potássio (mmol/L)	3.7		4.3		4.1	3.7	3.7
Cloretos (mmol/L)	116		116		113	108	105

Paciente 18	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,86	0,17	0,23	*	0,21	0,57	0,68
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	88,262	13,748	8,417	*	11,402	28,302	47,095
Número de vacúolo no núcleo	0,11	0,25	0,54	*	0,59	0,03	0,43
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	6,857	9,039	0,736	*	19,423	1,02	15,69
Hemoglobina (g/L)	13.3	9.7			9.3	6.7	8.0
Global de leucócitos (mm^3)	19.720				6.760	7.360	8.290
% Neutrófilos bastonetes	15				0	0	0
% Neutrófilos segmentados	65				79.5	87	82.8
Contagem de plaquetas	121.000	71.000			71.000	74.000	97.000
Tempo de Protombina/atividade	27.5/37%	19.7/57%			19.9/56%	17.8/67%	18.3/64%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	52	42			40	36	32
Relação paciente controle (PTT)	1.79	1.45			1.38	1.24	1.10
Relação normatizada internacional(RNI)	2.17	1.47			1.49	1.31	1.35
PH arterial	7.188	7.504			7.504	7.356	7.364
Lactato (mmol/L)	4.8				1.8	1.7	1.6
Sódio (mmol/L)	133	133.0			132	130	134
Potássio (mmol/L)	4.2	3.6			3.4	3.5	3.5
Cloretos (mmol/L)	112	107.0			108	102	103

* Amostra não coletada

Paciente 19	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	1,98	2,26	2,38	1,47	3,05	2,37	1,12
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	291,451	266,655	330,711	272,869	449,38	248,355	144,085
Número de vacúolo no núcleo	0,09	0,36	0,2	0,22	0,22	0,17	0,16
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	11,015	12,85	21,772	29,339	23,321	14,501	13,533
Hemoglobina (g/L)	13	13.1	14.3	12.9	10	9.7	9.8
Global de leucócitos (mm^3)	8.380	9.870		12.250	10.880	9.860	11.544
% Neutrófilos bastonetes	0	0		0	5	10	13
% Neutrófilos segmentados	69.8	75.7		75.3	74	64	50
Contagem de plaquetas	137.000	95.000		83.000	55.000	94.000	52.000
Tempo de protombina/atividade	24.6/44%	21.0/54%		34.9/29%	22.0/50%	23.0/47%	26.2/41%
Tempo de tromboplastina parcial ativada	86	39		101	51	47	45
Relação paciente controle (PTT)	2.77	1.26		3.26	1.65	1.52	1.45
Relação normatizada internacional(RNI)	1.86	1.54		2.80	1.63	1.72	2.00
PH arterial	7.064	7.204	7.266	7.195	7.260	7.263	7.277
Lactato (mmol/L)	4.8	5.9	5.5	9.4	9.9	7.7	10.6
Sódio (mmol/L)	139	137.0		140	138	135	136
Potássio (mmol/L)	4.6	4.6	5.6	4.2	5.0	5.1	4.9
Cloretos (mmol/L)	117			114	108	111	106

Paciente 20	T1	T6	T12	T18	T24	T48	T72
Número de vacúolo no citoplasma	0,57	0,06	0,81	0,37	*	0,14	0,39
Área vacúolo no citoplasma (μ^2)	69,891	7,154	93,702	37,216	*	10,163	45,235
Número de vacúolo no núcleo	0,02	0	0,02	0	*	0	0,01
Área vacúolo no núcleo (μ^2)	0,762	0	1,86	0	*	0	0,504
Hemoglobina (g/L)	7.9	8.5	8.8		8.4	6.6	6.3
Global de leucócitos (mm^3)	19.850	16.920	14.850		15.590	15900	17.870
% Neutrófilos bastonetes	18	5	0		3	0	2
% Neutrófilos segmentados	62	79	77.3		78	78.1	87
Contagem de plaquetas	155.000	150.000	157.000		145.000	134.000	161
Tempo de Protombina/atividade	22.8/47%	22.9/46%	21.1/51%		21.3/51%	18.7/62%	17.1/72%
Tempo de tromboplastina parcial a	29	34	32		33	31	31
Relação paciente controle (PTT)	1.00	1.17	1.10		1.14	1.07	1.07
Relação normatizada internacional	1.75	1.76	1.6		1.61	1.39	1.25
PH arterial		7.306	7.322		7.397	7.353	7.446
Lactato (mmol/L)		1.4	1.6		1.9	1.0	0.7
Sódio (mmol/L)	138	139.0	139		138	137	136
Potássio (mmol/L)	5.7	4.1	4.2		3.9	3.6	3.0
Cloretos (mmol/L)	116	116	116		116	110	104

*Lâmina confeccionada não permitiu a realização da morfometria dos vacúolos.