

BRUNO MARIANO DA SILVA SCHMIDT

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA LABORATORIAL, HEMODINÂMICA E DO FLUXO SANGUÍNEO TECIDUAL NO CHOQUE HEMORRÁGICO NÃO CONTROLADO EM RATOS SEM ROPOSIÇÃO VOLÊMICA E APÓS REPOSIÇÃO VOLÊMICA, NAS MODALIDADES NORMOTENSIVA E HIPOTENSÃO PERMISSIVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito final para obtenção do título de Mestre em Cirurgia

Área de Concentração: Choque Hemorrágico

Orientador: Prof. José Renan da Cunha Melo

Coorientador: Prof. João Baptista de Rezende Neto

BELO HORIZONTE

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Augusto Brandão Schmidt e Maria Regina da Silva Schmidt, cuja perda tanto me faz falta. Exemplos de honestidade e perseverança.

À minha avó, Alayde Brandão Schmidt, pelo amor e pela dedicação à tarefa de me conduzir até a vida adulta.

Às minhas tias Elisabeth e Maria Lúcia, pela torcida e pelo incentivo.

A toda minha grande família, que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e nas horas difíceis. Só tenho a agradecer a cada um deles.

Ao meu filho Victor, meu bem mais precioso.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor José Renan da Cunha Melo, pela oportunidade de realizar esta pesquisa e pelo rigor científico na condução deste trabalho.

Ao meu coorientador, Professor João Baptista de Rezende Neto, pelo convite de investir nesta empreitada e pela visão privilegiada e contagiante de quem é apaixonado pelo estudo do Trauma.

À Professora Ana Luiza Muccillo Baisch, por ter me iniciado na pesquisa científica.

Aos Professores Marcus Vinicius Melo de Andrade e Elizabeth Ribeiro da Silva.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Ao reitor da UFMG, Prof. Clélio Campolina Diniz e à vice-reitora Rocksane de Carvalho Norton.

Ao diretor da Faculdade de Medicina, Prof. Professor Francisco José Penna e ao vice-diretor, Prof. Tarcizo Afonso Nunes.

Ao Coordenador e à Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, Prof. Marcelo Dias Sanches e Profa. Ivana Duval de Araújo.

Aos acadêmicos do curso de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais: Philippe Chaves Winter, Mário Gissoni de Carvalho e Thiago de Assis Lisboa, que sacrificaram noites, fins de semana e vários dias de férias, ajudando-me com os experimentos.

*“Para examinar a verdade, é necessário, uma vez na vida,
colocar todas as coisas em dúvida o máximo possível.”*

RENÉ DESCARTES

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 CHOQUE HEMORRÁGICO E PRESSÃO ARTERIAL	18
3.2 REANIMAÇÃO NORMOTENSIVA E INFUSÃO VOLÊMICA MACIÇA	18
3.3 EFEITOS DELETÉRIOS DA REANIMAÇÃO VOLÊMICA MACIÇA COM CRISTALOIDES	20
3.4 HIPOTENSÃO PERMISSIVA	22
3.5 IMPACTO DOS ESTUDOS SOBRE HP NOS PROTOCOLOS DE ATENDIMENTO AO TRAUMA	24
3.6 ESTIMATIVA PERFUSÃO TECIDUAL PELO MÉTODO DE DEPOSIÇÃO DE MICROESFERAS	25
4. MÉTODO	28
4.1 ANIMAIS	28
4.2 ANESTESIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	28
4.3 CRONOLOGIA DOS TEMPOS CIRÚRGICOS	32
4.4 MEDIDA DA PERFUSÃO TECIDUAL ATRAVÉS DO MÉTODO DE DEPOSIÇÃO DE MEs	33
4.4.1 Base teórica	33
4.4.2 Infusão das microesferas	35
4.4.3 Preparo das amostras e recuperação das microesferas	36
4.4.4 Contagem de MEs nas amostras	37
4.4.5 Cálculo do fator de conversão (Fc):	38
4.4.6 Fluxo sanguíneo regional - Q_0 , ml/(min.g)	39
4.4.7 Débito cardíaco - DC, ml/min	40
4.4.8 Índice cardíaco - IC, ml/(min.100g) ⁻¹	40
4.4.9 Considerações sobre o método de deposição de MEs	40
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5. RESULTADOS	44
5.1 PESO DOS ANIMAIS	44
5.2 ANESTÉSICOS	44
5.3 QUANTIDADE DE CRISTALOIDES UTILIZADA NA REANIMAÇÃO	44
5.4 CURVAS DE PRESSÃO ARTERIAL	45
5.5 MORTALIDADE	46
5.6 HEMOPERITÔNIO (ML/KG)	47
5.7 DÉBITO CARDÍACO (DC, ML.MIN ⁻¹) E ÍNDICE CARDÍACO (IC, ML.MIN ⁻¹ .100G ⁻¹)	48
5.8 PERFUSÃO TECIDUAL (ML.G ⁻¹ . MIN ⁻¹)	50
5.9 EXAMES LABORATORIAIS	57
6. DISCUSSÃO	62
6.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO	62
6.1.1 Modelo animal de choque hemorrágico	62
6.1.2 Uso da heparina	63
6.1.3 Anestésicos	63
6.2 PRESSÃO ARTERIAL	64

6.3	MORTALIDADE	65
6.4	PERDA SANGUÍNEA	66
6.5	RESPOSTA HEMODINÂMICA E PERFUSÃO TECIDUAL	66
6.5.1	Fluxo Cerebral	67
6.5.2	Fluxo Cardíaco	68
6.5.3	Fluxo Renal	68
6.5.4	Fluxo Mesentérico, hepático e esplênico	69
6.5.5	Fluxo das artérias brônquicas	70
6.6	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	71
6.7	PERSPECTIVAS	71
7.	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. SEQUÊNCIA DA OPERAÇÃO _____	30
FIGURA 2. FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DOS EXPERIMENTOS E CURVAS DE PAM ESTIMADAS PARA CADA GRUPO. _____	33
FIGURA 3. CURVAS DE PRESSÃO ARTERIAL. _____	46
FIGURA 4. CURVA DE SOBREVIVÊNCIA (LOG RANK). _____	47
FIGURA 5. VOLUMES DE HEMOPERITÔNIO. _____	47
FIGURA 6. VALORES DE DÉBITO CARDÍACO. _____	49
FIGURA 7. VALORES DE ÍNDICE CARDÍACO. _____	50
FIGURA 8. FLUXO CEREBRAIS. _____	51
FIGURA 9. FLUXO CORONARIANOS. _____	51
FIGURA 10. FLUXO RENAIIS DIREITOS. _____	52
FIGURA 11. FLUXO RENAIIS ESQUERDOS _____	52
FIGURA 12. FLUXO ARTERIAIS HEPÁTICOS. _____	53
FIGURA 13. FLUXO VENOSOS PORTA HEPÁTICOS. _____	54
FIGURA 14. FLUXO INTESTINAIS. _____	55
FIGURA 15. FLUXO ESPLÊNICOS. _____	55
FIGURA 16. FLUXO DAS ARTÉRIAS BRÔNQUICAS. _____	56
FIGURA 17. NÍVEIS DE HEMOGLOBINA. _____	58
FIGURA 18. NÍVEIS DE PH. _____	59
FIGURA 19. NÍVEIS DE ÁCIDO LÁTICO. _____	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 PESO DOS ANIMAIS. _____	44
TABELA 2. ANESTÉSICOS _____	44
TABELA 3. VOLUME DE CRISTALOIDES INFUNDIDO DURANTE OS EXPERIMENTOS. _____	45
TABELA 4. VALORES MÉDIOS DE DÉBITO CARDÍACO E ÍNDICE CARDÍACO _____	49
TABELA 5. MEDIDAS DE FLUXO SANGUÍNEO REGIONAL _____	57
TABELA 6. EXAMES LABORATORIAIS _____	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AB	Artérias brônquicas
ACoTS	Coagulopatia da Hemorragia Aguda e do Trauma e Choque
AH	Artéria hepática
AL	Ácido láctico
AMP cíclico	Adenosina monofosfato cíclico
ATLS	Suporte Avançado de Vida no Trauma
BATLS	Versão militar do Suporte Avançado de Vida no Trauma
BE	Excesso de bases
Cer	Cérebro
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CH	Choque hemorrágico
Cntrl	Grupo controle
Cor	Coração
DO ₂	Oferta de oxigênio
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenoaminotetracético
ϵ_{ij}	Erro aleatório
f _{Am}	Fluorescência da amostra
Fc	Fator de conversão
fT	Fluorescência do tubo
Hb	Hemoglobina
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HP	Hipotensão permissiva
Htc	Hematócrito
IC	Índice cardíaco
IL	Interleucina
Int	Intestino
K ₂ PO ₄	Fosfato de potássio

KH_2PO_4	Di-hidrogenofosfato de potássio monobásico
ME	Microesferas
ME_{Am}	Quantidade de microesferas na amostra
ME_{Ref}	Quantidade de microesferas na amostra de referência
ME_{T}	Total de microesferas de uma cor infundido
NT	Reanimação normotensiva
P_{Am}	Peso da amostra
PAM	Pressão arterial média
PCO_2	Pressão de gás carbônico
PHTLS	Suporte Pré-hospitalar de Vida no Trauma
Plq	Contagem de plaquetas
PO_2	Pressão de oxigênio
Q_0	Fluxo sanguíneo regional
Q_{Ref}	Fluxosanguíneo de referência
RD	Rim direito
RE	Rim esquerdo
RL	Ringer lactato
RVC	Resistência vascular cerebral
SAMU	Serviço de Atendimento Móvel de Urgência
SR	Sem reanimação
τ_i	Efeito do i-ésimo nível do fator fixo
VO_2	Extração de oxigênio
VP	Veia porta
Y_{ij}	Valor assumido para a variável em estudo no i-ésimo nível do fator combinação entre grupo e medida em estudo
αTNF	Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

SCHMIDT, B. M. **Fluxo sanguíneo tecidual no choque hemorrágico após reposição volêmica normotensiva e hipotensão permissiva em ratos.** 2011. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Introdução: A hipotensão permissiva reduz a perda sanguínea no choque hemorrágico. Entretanto, questiona-se se a perfusão tecidual seria comprometida neste tipo de reposição volêmica. O objetivo do trabalho foi avaliar o fluxo sanguíneo tecidual no choque hemorrágico e reanimação volêmica com hipotensão permissiva ou normotensiva. **Método:** Ratos albinos machos (n=45) foram aleatorizados em 4 grupos: Simulado, sem reanimação (SR), hipotensão permissiva (HP) (60% da pressão arterial média) e reanimação normotensiva (NT). Choque hemorrágico não controlado foi induzido de forma padronizada. Os parâmetros hemodinâmicos foram monitorados continuamente, e reposição volêmica com cristalóide (Ringer Lactato) foi feita de maneira a manter a pressão arterial média em 60% do valor basal (Hipotensão Permissiva) ou em níveis semelhantes aos basais. O fluxo sanguíneo para o cérebro, coração, pulmões, rins, fígado, e intestinos foi determinado antes e 85 minutos após o tratamento do choque. Hemograma, lactacidemia, débito cardíaco e volume de sangue perdido foram determinados. Análise de variância com pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. **Resultados:** o grupo NT teve maior hemoperitônio e menores níveis de hematócrito e hemoglobina. Não houve diferença entre os níveis de ácido láctico entre os grupos HP e NT. O grupo SR teve fluxo sanguíneo tecidual menor e valor de ácido láctico maior. Não houve diferença no fluxo sanguíneo para nenhum órgão entre os grupos HP e NT. **Conclusão:** A HP resultou em menor perda sanguínea que a reanimação normotensiva no choque hemorrágico. A perfusão tecidual aferida pelo método de deposição de microesferas não mostrou diferença entre os animais com HP e os tratados por reposição volêmica normotensiva. O grupo SR teve a menor perda sanguínea e pior perfusão tecidual.

PALAVRAS CHAVE: Choque hemorrágico, Fluxo sanguíneo tecidual, Reanimação volêmica normotensiva, Hipotensão permissiva.

ABSTRACT

SCHMIDT, B. M. **Tissue perfusion in rats after hemorrhagic shock followed by normotensive resuscitation or permissive hypotension.** 2011. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Background: Permissive hypotension decreases blood loss in hemorrhagic shock. Concerns have been raised about organ perfusion with that strategy. We set forth to investigate regional organ perfusion with fluorescent microspheres during hemorrhagic shock treated with permissive hypotension and normotensive resuscitation. **Methods:** Male rats (n = 45) randomized to 4 groups: sham, no fluid (NF), permissive hypotension (PH) (60% of baseline mean arterial pressure - MAP), normotensive resuscitation (NBP). Uncontrolled hemorrhagic shock caused by a standardized injury; hemodynamic parameters were monitored continuously and lactated Ringer's was infused to maintain MAP 60% of basal levels (PH) or near those (NBP). Fluorimeter readings of regional blood flow of the brain, heart, lung, kidney, liver, and bowel were obtained at baseline and 85 minutes after shock, as well as, hemogram, lactic acid, cardiac output and blood loss. Intra-abdominal blood loss was assessed. Analysis of variance with Tukey post test was used for comparison. **Results:** Intra-abdominal blood loss was greater in NBP group, as well as, lower hematocrit and hemoglobin levels. No statistical difference in lactic acid levels between PH and NBP groups. NF animals had worse organ perfusion and higher lactic acidosis. No difference in organ perfusion between PH and NBP groups. **Conclusions:** PH resulted in less intra-abdominal bleeding than normotensive resuscitation after hemorrhagic shock. Organ perfusion assessed by fluorescent microspheres showed no difference in organ perfusion between PH and NBP resuscitation. NF group animals had low intra-abdominal bleeding, but worse organ perfusion.

KEYWORDS: Hemorrhagic shock, Tissular blood flow, Resuscitation, Permissive hypotension.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Trauma grave é a principal causa de morte nas primeiras quatro décadas de vida (1). No Brasil, é a segunda maior causa geral de morte (12%). Entre 1996 e 2006, morreram 1.348.224 pessoas vítimas de trauma (2). O choque hemorrágico está envolvido em 44% das mortes pré-hospitalares e 55% das mortes após a admissão hospitalar (3). Nos EUA, 80% das mortes nas primeiras horas após o trauma são causadas por hemorragia (4).

O controle mecânico da hemorragia grave constitui o método mais eficaz de tratamento (5). Até que se possa efetuar o controle mecânico, a conduta inicial amplamente difundida é a tentativa de estabilização hemodinâmica por meio da infusão de fluidos intravenosos (6-8).

As normas do *Advanced Trauma Life Support* (ATLS) propõem a reposição volêmica maciça com cristaloides para pacientes em choque hemorrágico, visando a restituir o débito cardíaco e a perfusão tecidual (9). Apesar dessa proposição, há evidências experimentais e clínicas de que a reposição volêmica com o objetivo de restaurar a pressão arterial a valores pré-choque compromete a hemostasia e exacerba o sangramento (8, 10).

Outros autores propõem reposição volêmica controlada, visando a manter a pressão arterial média em 60% do nível basal. Mostrou-se que essa abordagem, denominada hipotensão permissiva, resulta em menor sangramento e menor mortalidade (8, 10-15).

Suspeita-se, no entanto, que a hipotensão permissiva possa provocar hipoperfusão tecidual, agravando o estado de choque e culminando em falência de múltiplos órgãos (4, 16).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Verificar a resposta hemodinâmica e o fluxo sanguíneo tecidual após choque hemorrágico não controlado tratado com reposição volêmica normotensiva ou hipotensão permissiva.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Choque hemorrágico e pressão arterial

Choque é definido como perfusão tecidual inadequada, causando déficit de oxigênio e de nutrientes para suprir as demandas metabólicas celulares (17). A persistência do choque resulta em disfunção celular progressiva, culminando em falência múltipla de órgãos e morte (17-19).

No choque hemorrágico (CH), a pressão arterial pode ser mantida em níveis próximos da normalidade, apesar da queda do volume intravascular e do comprometimento da contratilidade miocárdica, por meio de mecanismo compensatório baseado principalmente na vasoconstrição arteriolar periférica (20). Esta, no entanto, não melhora o débito cardíaco nem a oxigenação tecidual, apesar de restabelecer parcialmente a pressão arterial (17).

A hipotensão é sinal tardio e pouco sensível de CH, havendo correlação direta entre a intensidade duração da hipotensão com a mortalidade (20). A presença de hipotensão (definida como pressão arterial sistólica inferior a 90 mmHg, na fase pré-hospitalar do trauma) está associada à mortalidade inicial de 12% e tardia de 32%, enquanto pacientes sem hipotensão pré-hospitalar têm mortalidade global inferior a 20%. Quando a hipotensão persiste por mais de 120 minutos, a mortalidade chega a 50%. Pacientes com pressão sistólica inferior a 70 mmHg nas primeiras 24h têm mortalidade superior a 60%. Além disso, a presença de hipotensão no período pré-hospitalar está relacionada à maior incidência de falência múltipla de órgãos e maior tempo de internação em unidade de terapia intensiva (21).

3.2 Reanimação normotensiva e infusão volêmica maciça

A infusão de cristaloides durante o tratamento do choque hemorrágico tornou-se prática corrente a partir dos anos 50, com o avanço do conhecimento da fisiopatologia do CH em modelos experimentais (4). Nesses modelos, a

infusão inicial de cristaloides, na proporção de três vezes o volume de sangue perdido (regra de 3:1) foi suficiente para corrigir o déficit de líquido extracelular e reduzir a mortalidade dos animais. Portanto, a infusão maciça de cristaloides passou a ser o ponto mais importante do tratamento inicial do choque hemorrágico (22).

Amplamente utilizada durante a Guerra do Vietnã após 1967, a reanimação volêmica com grande volume de cristaloides reduziu a incidência de necrose tubular aguda, comparada à da Guerra da Coreia (1950-1953). Apesar disso, não houve redução da mortalidade global (23, 24). Coincidentemente, surgiram os primeiros relatos de edema pulmonar não cardiogênico, denominado na época de “pulmão de choque” ou “pulmão de Da Nang”, que teve grande impacto na mortalidade após hemorragia grave (25).

Na década de 1980, com o avanço das técnicas de monitorização hemodinâmica, e a busca contínua pela manutenção da perfusão tecidual, passou-se a defender a “reanimação supranormal”, que estabelecia parâmetros hemodinâmicos acima dos níveis fisiológicos: índice cardíaco (IC) 50% maior que $4,5\text{l}/(\text{min. m}^2)$, oferta de oxigênio (DO_2) maior que $600\text{ ml}/(\text{min. m}^2)$, extração de oxigênio (VO_2) maior que $170\text{ ml}/(\text{min. m}^2)$ e 500 ml de sangue a mais que a média normal para a superfície corporal (26).

Apesar dessa abordagem, ensaio clínico com 75 pacientes vítimas de choque hemorrágico mostrou que a mortalidade do grupo que recebeu reanimação supranormal foi igual à do grupo controle. Portanto, não está comprovado que a reanimação supranormal reduz a mortalidade no trauma (27). Esse fato ocorre, em parte, devido ao aumento do dano celular induzido pelo excesso de oxigênio, substrato para a formação de radicais livres (20).

As diretrizes iniciais do ATLS recomendavam a infusão rápida de 2000 ml de Ringer lactato (RL) como parte do protocolo de tratamento do choque hemorrágico. O objetivo era restaurar o volume intravascular e equilibrar a oferta de oxigênio com as demandas teciduais (9). A normalização da pressão arterial era um dos parâmetros para atingir esse objetivo. Essa orientação persistiu até recentemente, quando a última edição do protocolo foi modificada para reposição

volêmica cautelosa antes do controle mecânico da hemorragia em vítimas de traumatismo penetrante no tronco (28).

3.3 Efeitos deletérios da reanimação volêmica maciça com cristaloides

Modelos experimentais e lições aprendidas em medicina de guerra têm papel crucial nas pesquisas sobre choque hemorrágico. Quase todos os avanços do conhecimento da fisiopatologia e da terapêutica no CH foram descritos utilizando modelos animais ou observações obtidas no tratamento de combatentes. Existem dois modelos relevantes de choque hemorrágico: choque controlado com volume ou pressão e os modelos de hemorragia não controlada (10, 29, 30).

Utilizando modelos experimentais, diversos estudos que compararam infusão volêmica maciça com restrição volêmica mostraram que a primeira causou maior perda sanguínea e maior mortalidade em animais submetidos a choque hemorrágico não controlado (13, 14, 16, 31-46). A reanimação maciça aumentaria o sangramento por interferir em dois mecanismos básicos da hemostasia: a formação do coágulo e a redução da pressão arterial (41).

A hemostasia é mecanismo complexo, que envolve a ativação das plaquetas, fatores de coagulação e a interação de ambos com a parede vascular.

Distúrbio de coagulação relacionado ao trauma ocorre em até 25% dos pacientes vítimas de trauma grave (47). Esse processo foi recentemente denominado coagulopatia aguda da hemorragia e do choque relacionados ao trauma (*Acute coagulopathy of trauma-shock* – ACoTS) (47). Sua etiologia é multifatorial e inclui entre outros: trauma tecidual, hemodiluição, acidose, consumo de fatores de coagulação, hipotermia e inflamação (10, 47, 48).

Os efeitos prejudiciais de alguns desses fatores na coagulação são bem conhecidos, como a hemodiluição devido ao excesso de cristaloides e fluidos pobres em fatores de coagulação. A hipotermia, por exemplo, altera a atividade do fator de coagulação VIIa (redução de 50% a 28°C) e interfere na resposta

hemodinâmica ao choque (47). A acidose reduz a atividade dos fatores de coagulação, prolonga o tempo de formação e diminui a resistência do coágulo (49, 50).

O papel do aumento da pressão arterial na hemostasia também foi investigado. Mostrou-se que, no CH não controlado, a restauração rápida da pressão arterial é capaz de expulsar coágulos formados nos vasos lesados, provocando ressangramento, principalmente nos primeiros minutos após o trauma, quando ainda estão vulneráveis devido à exígua trama de fibrina (10, 30-32). Em modelo suíno de CH não controlado, observou-se que animais submetidos à reposição volêmica com RL ressangravam ao atingir PAM de 64 ± 2 mmHg (51).

Os dois principais mecanismos envolvidos no desalojamento dos coágulos são: aumento súbito do diâmetro do vaso lesado e diminuição da viscosidade sanguínea. Segundo a lei de Laplace, o aumento radial do vaso eleva, em proporção direta, a tensão sobre suas paredes e, conseqüentemente, no coágulo. Já a redução da viscosidade sanguínea aumenta o fluxo de sangue em torno e através do coágulo, de acordo com a Lei de Poiseuille (41, 52).

A reanimação maciça com cristaloides também altera a função pulmonar (12, 23, 48). O aumento da pressão hidrostática capilar reduz a pressão oncótica intravascular e diminui a drenagem linfática pulmonar, ao elevar a pressão venosa central. Esses mecanismos, associados ao aumento da permeabilidade capilar causado pelo fenômeno de isquemia-reperfusão, provocam deslocamento de plasma do espaço intravascular para o interstício pulmonar, prejudicando as trocas gasosas (53). Estudo recente correlacionou infusão volêmica intraoperatória à incidência de edema pulmonar não cardiogênico. Ajustando os resultados com covariáveis como presença de infecção e pontuação na escala APACHE II, constatou-se que a infusão de cristaloides superior a 20 ml/(kg.h) aumentou o risco de edema pulmonar não cardiogênico em quase quatro vezes comparada à infusão inferior a 10 ml/(kg.h) (*odds ratio* de 3,8; $p=0,04$) (54).

A sobrecarga de cristaloides altera a função celular, ao sobrepujar mecanismos intrínsecos que mantêm as células em estreitas faixas de volume. O aumento da pressão hidrostática e a diminuição da osmolaridade extracelular

provocam influxo de água através da membrana celular, diminuindo o pH citoplasmático e a concentração de proteínas, resultando em queda da fosforilação oxidativa, vital para a produção eficiente de energia (48).

A infusão excessiva de cloreto de sódio provoca acidose hiperclorêmica e agrava a acidose láctica frequentemente encontrada em pacientes em CH (48). A acidose diminui a contratilidade cardíaca, a sensibilidade das fibras cardíacas ao cálcio e ao AMP cíclico, e reduz a resposta adrenérgica aos agentes inotrópicos (55).

A resposta inflamatória é exacerbada pela sobrecarga de cristaloides. O edema celular ativa a fosfolipase A2, resultando em aumento da produção de prostaglandinas, lipoxigenase, leucotrienos e ácidos epoxieicosanóicos. A produção do fator de necrose tumoral alfa (α TNF) pelos macrófagos e a secreção de interleucinas (IL-6, IL-8 e IL-10) pelo sistema retículo-endotelial são exacerbadas pela reanimação volêmica maciça no CH (48).

A síndrome compartimental abdominal é outra complicação grave da infusão maciça de fluidos (12, 56). A hipertensão abdominal, pródromo da síndrome de compartimento, está presente em até 85% dos pacientes com balanço hídrico positivo superior a 5 litros. Caso a descompressão precoce não seja realizada, a mortalidade pode chegar a 70% (57).

3.4 Hipotensão permissiva

Hipotensão permissiva (HP) é definida como a manutenção deliberada de níveis pressóricos mais baixos em pacientes com hemorragia grave, até que se obtenha controle definitivo do sangramento (28). O objetivo é repor volume, restaurar o fluxo microvascular e o transporte de oxigênio, sem interferir sobre os mecanismos de hemostasia.

As origens da HP remontam à época da Primeira Guerra Mundial. Em 1918, observou-se que combatentes em CH perdiam mais sangue quando submetidos à reanimação volêmica antes do controle da hemorragia (58). Apesar disso, a HP não foi incorporada à prática clínica e somente nas últimas duas

décadas passou a ser vista como alternativa no tratamento do choque hemorrágico.

A maioria dos estudos considera HP como a manutenção da pressão sistólica entre 80 e 90 mmHg ou da PAM entre 50 e 65 mmHg para pacientes previamente normotensos. Sugere-se que, na hemorragia não controlada, a redução moderada da pressão arterial diminui a perda sanguínea, com manutenção da viabilidade dos tecidos pela autorregulação do fluxo sanguíneo (11).

Ensaio clínico comparando diferentes estratégias de reanimação volêmica com a HP são raros. Um dos estudos não mostrou diferença em relação à sobrevivência dos pacientes com essa estratégia comparada à reposição normotensiva, provavelmente porque no grupo de HP, a pressão arterial não foi diferente do grupo de ressuscitação normotensiva em mais de 75% dos pacientes (59).

Apesar de não se tratar de estudo de HP propriamente dita, outro estudo demonstrou que a restrição volêmica pré-operatória é vantajosa. Quinhentas e noventa e oito vítimas de traumatismos penetrantes no tronco, com pressão arterial sistólica, na cena, igual ou inferior a 90 mmHg, foram alocados em dois grupos. O primeiro recebeu cristaloides desde o atendimento inicial até a chegada à sala de emergência, mantendo infusão rápida se a pressão arterial sistólica estivesse abaixo de 100 mmHg. O segundo grupo não recebeu soro até que chegasse à sala de cirurgia (8).

Os resultados demonstraram mortalidade maior no grupo que recebeu mais soro (62% vs 70% $p=0,04$), confirmando resultados de estudos experimentais (13, 14, 37, 41, 43, 44, 60). Apesar disso, houve várias controvérsias sobre o estudo, principalmente em relação a falhas na metodologia. Em outro estudo, foram alocados 1039 pacientes atendidos por equipes de resgate, vítimas de trauma moderado ou grave. Foram comparados os resultados da infusão rápida de cristaloides e coloides com os de nenhuma reanimação volêmica. Não foi constatada diferença de mortalidade entre os grupos (10,4% vs 9,8%) (61).

A estratégia de HP foi avaliada em modelo de lesão provocada por explosão em suínos (62). Os autores encontraram maior mortalidade nos animais submetidos a HP em comparação com RN. Nesse estudo, no entanto, os animais eram submetidos à esplenectomia e a sangramento controlado antes da lesão causada pela explosão; não sendo, portanto, modelo ideal para avaliar a HP. Além disso, a hemorragia controlada pode ter protegido o animal de possível ressangramento provocado pela reposição volêmica normotensiva, interferindo nos resultados quando comparados à HP. A explosão ocorreu há 2,15 metros dos animais, distância que resultou em 100% de sobrevivência em outros estudos que utilizaram a mesma carga de explosivos (63). Portanto, foi empregado modelo de CH quase totalmente controlado (62).

3.5 Impacto dos estudos sobre HP nos protocolos de atendimento ao trauma

Os resultados dos estudos experimentais de CH não controlado e o trabalho publicado por Bickell e colaboradores, em 1994, tiveram impacto sobre os protocolos de reposição volêmica no trauma civil e militar (8).

O *PreHospital Trauma Life Support* (PHTLS) (7), atualmente, prioriza a remoção rápida das vítimas de CH para o pronto-socorro a permanecer na cena do trauma procurando estabilizar o paciente antes de transportá-lo.

O manual do *Battlefield Advanced Trauma Life Support* (BATLS), curso de atendimento pré-hospitalar das forças armadas do Reino Unido, recomenda reanimação volêmica restrita em pacientes em choque hemorrágico não controlado, por infusão de coloides ou cristaloides até o restabelecimento do nível de consciência e do pulso radial (pressão arterial sistólica acima de 80 mmHg) (6).

As forças de defesa israelenses orientam esquemas de reanimação diferenciados de acordo com o tipo CH abordado. No CH não controlado são seguidos princípios de reanimação hipotensiva (18).

O *US Military's Committee on Tactical Combat Casualty Care* (23) preconiza reposição volêmica de baixo volume, utilizando coloides e HP, além de priorizar o controle precoce da hemorragia e evitar a reanimação volêmica maciça. Essa estratégia, aliada à reanimação com hemoderivados (hemácias, plaquetas e plasma fresco congelado) na proporção de 1:1:1 é atualmente empregada nas guerras do Iraque e Afeganistão. Estudos recentes demonstraram redução de mortalidade de soldados feridos em combate (64).

Somente na 8ª edição do ATLS (2008), a HP foi mencionada como alternativa de abordagem inicial do CH não controlado, principalmente em traumatismos penetrantes no tronco. Entretanto, os autores advertem sobre o uso da HP na vigência de traumatismo contuso, especialmente quando associado a traumatismo crânio-encefálico (28).

3.6 Estimativa perfusão tecidual pelo método de deposição de microesferas

O método de deposição de MEs para análise da perfusão tecidual foi descrito, em 1967, para medida do fluxo sanguíneo tecidual intraútero de fetos de ovinos (65). Em 1976, a técnica foi modificada para estudo da perfusão tecidual sistêmica de ratos (66).

O método de deposição de microesferas radiomarcadas é o padrão para avaliação do fluxo sanguíneo regional. Entretanto, o uso de materiais radioativos traz dificuldades de armazenamento, manipulação e descarte, além de ser restrito por razões legais. Por isso, foram desenvolvidas MEs fluorescentes, que têm menor custo e acurácia semelhante ao método com MEs radioativas, com a vantagem de evitar os inconvenientes da radioatividade (67-72).

Determina-se o fluxo sanguíneo tecidual infundindo-se MEs marcadas na circulação sistêmica (átrio ou ventrículo esquerdo) do animal em estudo. Após a injeção, as MEs se misturam ao sangue arterial e são levadas pela corrente sanguínea até os tecidos, onde ficam impactadas nos capilares de menor calibre (73).

As injeções não provocam perturbações hemodinâmicas em ratos, mesmo no caso de infusões com mais de 300.000 MEs de 15 μ m (74-77).

O método de deposição de MEs determina apenas o fluxo arterial sistêmico, portanto, características especiais da circulação de alguns tecidos devem ser observadas. Locais de circulação tipo porta, como fígado e hipófise possuem duas vias de fluxo aferente: arterial e venosa. Nesse caso, somente o fluxo arterial será detectado pelos métodos de deposição de MEs. No fígado, por exemplo, o fluxo da veia porta poderá ser medido diretamente pela infusão de MEs na veia porta ou indiretamente, pela soma dos fluxos dos intestinos, pâncreas, mesentério e baço (68, 78).

A circulação pulmonar também tem características peculiares, pois o fluxo sistêmico provém das artérias brônquicas, superado em 9 a 56 vezes pelo fluxo da artéria pulmonar. Contudo, de 4% a 36 % das MEs de 15 μ m injetadas no ventrículo esquerdo chegam aos pulmões pela artéria pulmonar através de derivações arteriovenosas (79).

MÉTODO

4. MÉTODO

4.1 Animais

Quarenta e cinco ratos albinos machos, pesando entre 250 e 320g e alimentados *ad libitum* com ração própria (Purina® Ratochow, Caxias-RS) foram alocados por meio de tabela de números aleatórios em quatro grupos: Simulado, Sem reposição (SR), Hipotensão Permissiva (HP) e Reanimação Normotensiva (NT).

Todos os animais utilizados foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Minas Gerais, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Instituição (CETEA, protocolo 121/2008).

4.2 Anestesia e procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com 60 mg/kg de cetamina (Rhabifarma Indústria Farmacêutica LTDA., Hortolândia-SP) associada a 15 mg/kg de xilazina (Rhabifarma Indústria Farmacêutica LTDA., Hortolândia-SP) por via intraperitoneal. Durante os experimentos, os animais mantiveram plano anestésico superficial (ventilação espontânea) com *bolus* de 2,5 mg de cetamina associado a 1 mg de xilazina, conforme a necessidade.

Os animais anestesiados foram colocados em decúbito dorsal, com os quatro membros presos à placa de madeira de 20 x 15 cm por fita adesiva. A região cervical foi incisada com tesoura e a traqueia dissecada e intubada com cateter plástico 14G (Smiths Medical do Brasil Produtos Hospitalares, São Paulo-SP) cortado de modo a medir 2,5 cm de comprimento.

A veia jugular esquerda, a artéria carótida direita e a artéria femoral direita foram dissecadas, ligadas distalmente e canuladas com cateteres de polietileno com 15 cm de comprimento (PE50 – Clay Adams, Becton Dickinson, Sparks, MD-USA). Cada cânula teve uma das pontas biselada e a outra adaptada à agulha de seringa 25x7mm (Becton Dickinson Ind. Cir. LTDA., Curitiba-PR). O lúmen de

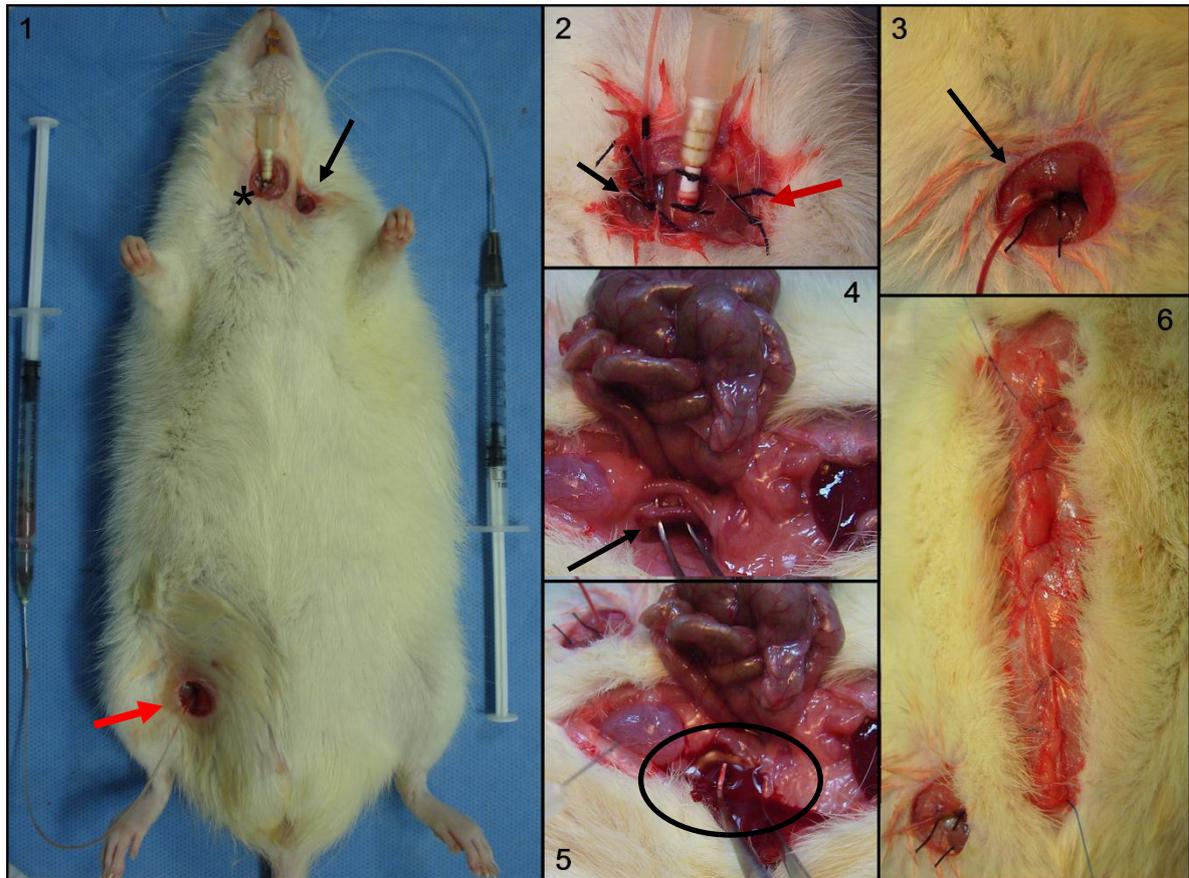
cada cânula foi preenchido com soro fisiológico a 0,9% contendo heparina (Parinex Hipolabor, Sabará-MG) na concentração de 5 U.I./ml.

As cânulas inseridas nas artérias femoral e carótida direitas foram conectadas ao sistema Biopac (Biopac Systems Inc., CA-USA), por meio de transdutor de pressão para registro contínuo da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca. O cateter da carótida direita foi inserido, por via retrógrada, no ventrículo esquerdo.

O posicionamento correto do cateter no ventrículo esquerdo foi confirmado pelo registro de ondas pressóricas características no Biopac: amplitude muito acentuada, com pressão máxima próxima a 100 mmHg e pressão mínima negativa ou próxima de zero.

A PAM registrada pelo cateter femoral foi verificada por um minuto a período de 5 minutos. As curvas pressóricas eram monitorizadas continuamente em monitor de computador acoplado ao sistema Biopac.

Após a estabilização da pressão arterial (PA), seguiu-se a infusão do primeiro bolus de microesferas (MEs), tempo denominado T0. A seguir, os animais foram submetidos à laparotomia mediana de 4 cm. A aorta infra-renal foi identificada e reparada. Todos os animais, com exceção daqueles do grupo Simulado, foram submetidos a punção transfixante da aorta com agulha de 25G (Becton Dickinson Ind. Cir. LTDA., Curitiba-PR). Seguiu-se imediato fechamento do peritônio e das camadas musculares com sutura contínua, usando fio de náilon 3-0 agulhado (Polysuture®, São Sebastião do Paraíso-MG). A figura 1 mostra a sequência do procedimento cirúrgico.

Figura 1. Sequência da operação

1 – traqueostomia (*), cânula inserida na veia jugular esquerda (seta preta) e artéria femoral direita (seta vermelha). 2 – traqueostomia, acesso carotídeo direito (seta preta) e jugular esquerdo (seta vermelha). 3 – Acesso na artéria femoral direita (seta preta). 4 – Laparotomia, mobilização das alças intestinais e exposição da aorta infra-renal (seta preta). 5 - transfixação da aorta com agulha de 25G. 6 – Laparorráfia com náilon 3-0.

Foram utilizados apenas os animais nos quais a PAM caiu para menos de 40 mmHg e que se mantiveram vivos por 15 minutos, com respiração espontânea após a lesão da aorta, período denominado T1. Animais que não preenchem esse requisito foram eutanasiados com sobredoses de anestésicos.

O tempo decorrido até a morte e o grupo ao qual pertencia todo animal morto antes do final do experimento foi anotado.

Após o período de 15 minutos da lesão aórtica (T1), foi iniciada reposição volêmica endovenosa com RL (Fresenius Kabi Brasil LTDA., Aquiraz - CE). A reanimação foi mantida por 70 minutos, período denominado T2.

O RL foi infundido em temperatura ambiente, por de bomba de infusão (modelo Minipuls 3, Gilson, Villiers Le Bel – FR) conectada ao cateter jugular, com

fluxo de 1,4 ml/(kg.min). A infusão foi mantida ou descontinuada conforme a meta de PAM designada para cada grupo:

- I. **Grupo NT (n=6) – pressão arterial média (PAM) de 75 a 80 mmHg.**
- II. **Grupo HP (n=6) - pressão arterial média (PAM) de 55 a 60 mmHg.**
- III. **Grupo SR (n=6) – não recebeu reposição volêmica.**

Ao grupo Cntrl (controle) foram atribuídos os registros hemodinâmicos de todos os animais em T0. Quatro animais tiveram o sangue coletado em T0 para exames laboratoriais, através de aspiração de sangue pela carótida, e a seguir eutanasiados. Estes exames foram utilizados como parâmetros de referência, já que estes animais não foram submetidos a nenhum procedimento adicional.

Ao término de T2, novo bolus de MEs foi injetado no ventrículo esquerdo, período de tempo denominado T3. Ao final deste, a reanimação volêmica foi interrompida e o volume total de RL infundido foi registrado.

Seguiu-se coleta de 4 ml sangue da artéria carótida para seringa de 5 ml (Becton Dickinson Ind. Cir. LTDA., Curitiba-PR), contendo 0,1 ml de heparina (Parinex® Hipolabor, Sabará-MG). As amostras foram enviadas em três recipientes para exames laboratoriais: 1,5 ml em frasco contendo EDTA (Greiner Bio-One Brasil LTDA., Americana – SP), 1,5 ml em frasco contendo fluoreto de sódio (Greiner Bio-One Brasil LTDA., Americana – SP) e 2 ml sem anticoagulante para gasometria arterial.

Foram realizados os seguintes exames laboratoriais: eritrograma, contagem de plaquetas, gasometria arterial e dosagem de lactato.

Os animais que permaneceram vivos, após a coleta, foram mortos por exsanguinação pelo cateter da carótida.

O tempo total de CH foi de 85 minutos. As pressões arteriais foram mantidas nos respectivos níveis predeterminados para cada grupo, exclusivamente pela infusão de RL. Não foram feitas tentativas de interromper eventuais aumentos espontâneos da PAM acima dos valores pré-determinados para o grupo.

4.3 Cronologia dos tempos cirúrgicos

A razão da escolha dos tempos utilizados nos experimentos tem fundamento na simulação do que ocorre nos traumatismos em humanos, a saber – T0 = tempo até a chegada da equipe de resgate ao local do acidente; T1 = primeiro atendimento e obtenção de acesso venoso; T2 = tempo de reanimação volêmica, de transporte do acidentado até o hospital, de entrada na sala de emergência, até o controle vascular da lesão por cirurgia; T3 = refere-se aos cinco minutos que se seguem a T2, necessários para avaliação laboratorial e hemodinâmica das alterações causadas pelo choque hemorrágico e pelos métodos de reanimação utilizados.

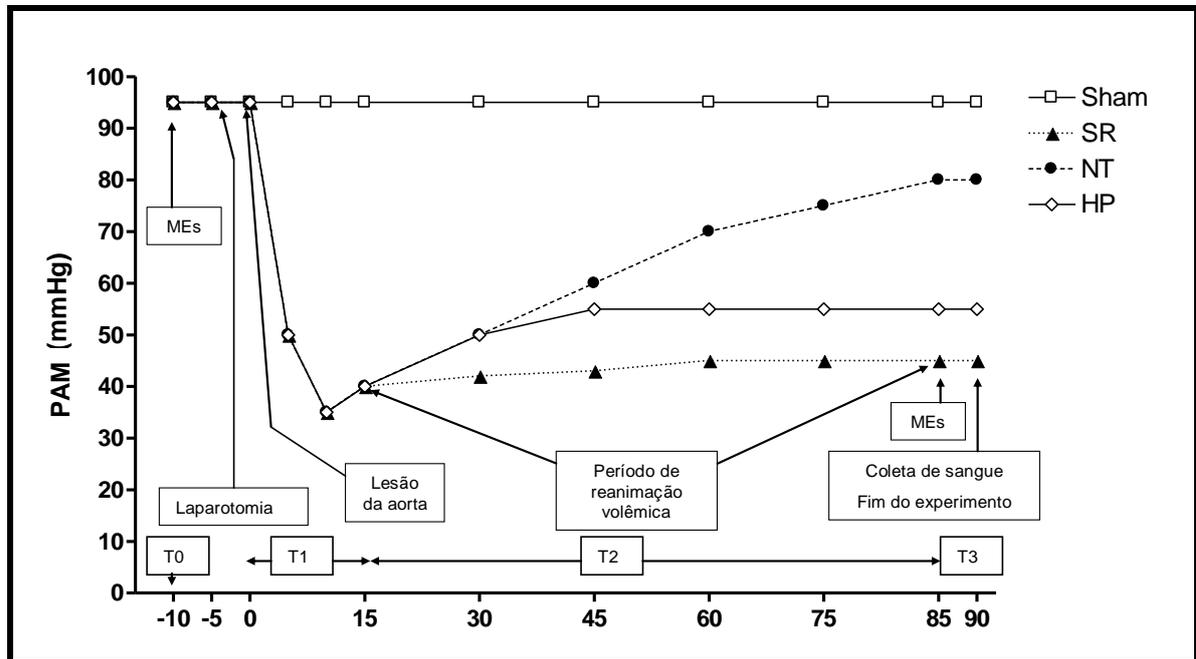
O registro hemodinâmico foi iniciado logo após a estabilização da PAM, cerca de 5 minutos após a conexão dos cateteres ao sistema Biopac.

Após T0, simulou-se o traumatismo através de laparotomia e punção da aorta infrarrenal com agulha 25G. Iniciou-se o tempo T1, de 15 minutos de duração, compreendendo o intervalo entre a ocorrência do traumatismo e obtenção de acesso vascular pelas equipes de resgate.

O intervalo T2, com duração de 70 minutos, refere-se ao período de reanimação volêmica diante da lesão vascular grave não controlada. Como visto, simula o período de tempo gasto pelas equipes de resgate durante a remoção do traumatizado até o centro de trauma, somados ao período pré-operatório na sala de emergência e operatório até o controle vascular da lesão. O tempo T3 refere-se aos cinco minutos que se seguem após T2, nos quais se mede a perfusão tecidual pela injeção de MEs de cor diferente das utilizadas em T0 e se obtém amostras de sangue para exames laboratoriais. Este período reflete o status hemodinâmico e as alterações laboratoriais determinadas pelo CH não controlado e pelos métodos de reanimação, quando utilizados. Os animais que sobreviveram à coleta de sangue para exames laboratoriais foram eutanasiados por exanguinação.

A Figura 2 resume as etapas dos experimentos e a curva de PAM estimada para cada grupo.

Figura 2. Fluxograma ilustrativo das etapas dos experimentos e curvas de PAM estimadas para cada grupo.



O volume do hemoperitônio foi quantificado após o experimento da seguinte maneira: o abdome dos ratos foi reaberto e o sangue juntamente com os coágulos foi evacuado da cavidade abdominal com gazes secas. A diferença de peso entre as gazes antes e depois da retirada de sangue do abdome foi convertida em volume do sangramento: cada grama da diferença no peso da gaze foi atribuído como correspondente a um mililitro de sangue ou coágulo.

4.4 Medida da perfusão tecidual através do método de deposição de MEs

4.4.1 Base teórica

Assumindo que apenas o débito cardíaco (DC) determine a distribuição das MEs nos tecidos, a perfusão sanguínea de determinado órgão ou tecido terá proporção direta com a densidade de MEs aprisionadas na amostra tecidual (68, 80).

Partindo desse princípio, pode-se inferir que o fluxo sanguíneo (Q_0) para um órgão qualquer (Q_{0A}), dividido pelo número de MEs aprisionadas em seu leito capilar (ME_A) seja igual à razão do fluxo sanguíneo de outro órgão (Q_{0B}) pelo número de MEs nele contidas (ME_B).

Dessa forma, o fluxo sanguíneo de cada órgão pode ser calculado, desde que se saiba a quantidade de MEs contidas em cada um, assim como o fluxo sanguíneo e a quantidade de MEs contidas em pelo menos um órgão. Estes valores são chamados fluxo de referência (Q_f) e quantidade de MEs de referência (ME_f).

$$Q_{0A}/ME_A = Q_{0B}/ME_B = Q_{Ref}/ME_{Ref}$$

Utilizando bomba de infusão/sucção, conectada a uma artéria grande calibre e calibrada para coletar sangue com débito pré-fixado até um tubo de ensaio, pode-se nesse caso, quantificar-se o fluxo sanguíneo para o recipiente (Q_f) bem como o seu conteúdo de MEs (ME_f).

Assumindo que determinado órgão seja o animal inteiro, seu fluxo sanguíneo seria a soma do débito arterial para todos os tecidos, ou seja, o DC. E o conteúdo de MEs deste órgão seria o volume de MEs injetadas (ME_T):

$$Q_{0A} = DC \quad \text{e} \quad ME_A = ME_T$$

Como as preparações comerciais contêm 1.000.000 de MEs por mililitro (ml), é possível saber-se a quantidade de MEs infundidas no volume da suspensão injetada. Dessa forma, pode-se calcular o DC global e o fluxo sanguíneo para órgão alvo qualquer, utilizando-se a fórmula:

$$DC/ME_T = Q_{Ref}/ME_{Ref}$$

4.4.2 Infusão das microesferas

Foram utilizadas soluções de microesferas fluorescentes com 15 µm de diâmetro, contendo 10⁶ MEs de poliestireno por ml (Fluorspheres Blood Flow Determination, Molecular Probes; Eugene, OR-USA). As microesferas nas cores vermelha (comprimento de onda de absorção/emissão em água de 580/605 nm), azul-verde (505/515 nm), azul (625/645 nm) e laranja (540/560 nm) foram dissolvidas em solução composta por NaCl (0,15 M) Tween 20 (0,05%) e timerosal (0,002%), armazenadas entre 2 e 4 °C e protegidas da luz.

Imediatamente antes de sua utilização, as MEs eram colocadas em suspensão, agitando os frascos que as continham com vórtex (Scientific Industries® Inc., Bohemia, NY-USA) por um minuto. Seguia-se sonicação (Vibra-Cell VCX 750 Sonicator, Sonics & Material®, Newtown-USA) por mais um minuto para dissolver possíveis microagregados de MEs.

Após sonicação, 0,3 ml da suspensão de microesferas (cerca de 300.000 MEs) eram aspirados com seringa de 1 ml (Becton Dickinson Ind. Cir. LTDA., Curitiba-PR).

Para a infusão das MEs, as cânulas das artérias femorais e carótida direita eram temporariamente desconectadas do Biopac. O cateter da artéria femoral era conectado à bomba peristáltica (modelo Minipuls 3, Gilson®, Villiers Le Bel – FR) para coleta de sangue, calibrada para aspirar 0,7 ml/min de sangue para tubo de ensaio, e o cateter da carótida era conectado à seringa contendo as MEs.

A seguir, a bomba era ligada. No décimo segundo de coleta, injetava-se 0,3 ml da solução de MEs no cateter da carótida, no intervalo de 20 segundos. Após a injeção, o volume de sangue coletado era repostado com 2 ml RL pela cânula da carótida, durante os 60 segundos restantes da coleta. A solução de RL servia, também, para mobilizar as MEs que porventura ficassem retidas no interior da cânula. A bomba de infusão era desligada, totalizando 90 segundos de coleta de sangue da artéria femoral.

A seguir, as cânulas eram reconectadas ao sistema Biopac, e as amostras de sangue coletadas eram separadas e identificadas.

4.4.3 Preparo das amostras e recuperação das microesferas

As duas amostras de sangue coletadas pela bomba de infusão, o hemisfério cerebral esquerdo, os rins direito e esquerdo, coração, pulmões, intestinos, estômago, mesentério, pâncreas, baço e fígado foram retirados, pesados individualmente e colocados em tubos de centrífuga de 35 mm por 105 mm (Sorval Legend Mach 1.6-R, Thermo Scientific, Waltham, MA-USA).

No tubo utilizado para estimativa do fluxo venoso porta, separaram-se fragmentos correspondentes a um quinto do peso de cada um dos seguintes órgãos: estômago, intestinos, pâncreas, mesentério e baço.

O número de MEs fluorescentes era calculado pela medida da fluorescência das amostras. Para isso, as MEs precisaram ser separadas dos tecidos.

Após separação e identificação dos tubos contendo as amostras, procedia-se a digestão dos tecidos por adição de 8 ml de solução de lise a cada tubo. Essa era a primeira etapa para a separação das MEs das amostras. A composição da solução foi preparada com 44,88 g de hidróxido de potássio (Vetec Química Fina LTDA., RJ-RJ) + 8 ml de Tween 80 (Isofar Ind. Com. De Produtos Químicos LTDA, Duque de Caxias-RJ) + 400 ml de etanol a 92,8 ° INPM (Minálcool®, Minaçúcar S/A, Santa Rosa do Viterbo-SP).

Os tubos contendo as amostras foram colocados em banho-Maria a 60 °C por 6 horas, seguindo-se agitação com vórtex e sonicação até a dissolução completa dos fragmentos, e centrifugação das amostras por 15 minutos a 1500 g (Sorval Legend Mach 1.6-R, Thermo Scientific, Waltham, MA-USA).

Por possuírem gravidade específica superior à solução de hidróxido de potássio, centrifugaram-se as amostras com MEs em suspensão para que estas se precipitem no fundo dos tubos e possam ser separadas da solução.

Soluções alcalinas interferem na leitura da fluorescência das amostras. Por isso, os resquícios da solução de lise precisaram ser retirados das amostras e neutralizados com solução tampão, acrescentando-se 1 ml de água deionizada ao precipitado, seguindo-se agitação com Vórtex e adição de 9 ml de solução de álcool-Tween (995 ml de álcool absoluto + 5 ml de Tween 80).

Centrifugaram-se novamente as amostras e o sobrenadante foi pipetado e descartado. Adicionaram-se 5 ml de solução tampão-fosfato a 0,1 M, pH 7, que consistia em 10,712 g de fosfato de potássio (K_2PO_4) + 5,239 g de di-hidrogenofosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) por litro de água destilada, seguindo-se agitação com vórtex e adição de 4 ml de álcool absoluto.

As amostras foram novamente centrifugadas, e o sobrenadante foi pipetado e descartado. Após a retirada de todo solvente, as MEs purificadas foram dissolvidas em 4 ml de acetato de etila (Labsynth, Diadema-SP) agitando-as com o vórtex por 60 segundos e deixando-as em câmara escura por 10 minutos. O acetato de etila dissolve as MEs e libera os pigmentos fluorescentes passíveis de serem quantificados no espectrofluorímetro. A leitura no espectrofluorímetro era feita em, no máximo, 60 minutos para evitar perda da fluorescência, pois a solução é sensível à luz.

A medida da fluorescência foi feita adicionando 2 ml do sobrenadante da amostra à cubeta do espectrofluorímetro (modelo UV-3600-UV-VIS-NIR Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD-USA). O aparelho foi calibrado de modo a medir a fluorescência de acordo com a faixa de emissão/absorção correspondentes às cores de MEs utilizadas no experimento. Entre leituras de amostras diferentes, a cubeta foi lavada com acetato de etila.

4.4.4 Contagem de MEs nas amostras

Como a quantidade de MEs de cada amostra tem relação direta com sua respectiva fluorescência, a contagem de MEs pode ser feita indiretamente, a partir da medida da fluorescência de amostra com quantidade de MEs conhecida. Neste caso, quantificou-se fluorescências de 10 μ l da preparação comercial (FL₁₀, com

10.000 MEs) e de cada amostra de tecido (FL_A) para obter-se o número de MEs contidas em cada uma, de acordo com a fórmula:

$$FL_A / ME_A = FL_{10} / 10.000$$

A medida do fluxo sanguíneo pode ser feita em diversos momentos, no mesmo animal. Para tanto, cada injeção deve conter MEs com espectros de fluorescência diferentes. Cada espectro de fluorescência pode ser quantificado no espectrofluorímetro, pois cada cor de ME absorve energia de um comprimento de onda excitatório específico e imediatamente a emite na forma de luz com comprimento de onda também específico. Uma amostra, portanto, pode conter MEs de diversas cores fluorescentes, sem que uma cor influencie a medida da fluorescência de outra (69, 70).

4.4.5 Cálculo do fator de conversão (F_c):

O F_c é um coeficiente utilizado para calcular a quantidade de MEs de determinada cor em uma amostra. O F_c é a média obtida a partir de três tubos contendo uma quantidade conhecida de MEs de determinada cor, e deve ser feito para cada cor (faixa de espectro) de ME utilizada nos experimentos. O preparo das amostras para obtenção do F_c foi feito como se segue:

- Tubo 1: pipetaram-se 10 μ l da solução de MEs (10^4 MEs), da cor específica utilizada na injeção, em um tubo contendo 4 ml de acetato de etila, seguiu-se agitação com vórtex. O tubo 1 teria, portanto, 2.500 MEs/ml.
- Tubo 2: pipetaram-se 2 ml do conteúdo do tubo 1, adicionando-se a tubo contendo 2 ml de acetato de etila. Seguiu-se agitação do tubo com vórtex. O tubo 2 teria, portanto 1.250 MEs/ml.
- Tubo 3: pipetaram-se 2 ml da solução do tubo 2, adicionando-se a tubo contendo 2 ml de acetato de etila. Seguiu-se agitação do tubo com vórtex. O tubo 2 teria, portanto 625 MEs/ml

A partir da leitura da fluorescência de cada tubo no espectrofotômetro, obteve-se o F_c pela fórmula:

$$F_c = \frac{5000/fT_1 + 2500/fT_2 + 1250/fT_3}{3}$$

Em que fT é a fluorescência obtida da leitura de 2 ml de cada tubo no espectrofluorímetro. Multiplicando-se o F_c pela fluorescência de uma amostra (ambos para o mesmo espectro de ME), obteve-se a quantidade de MEs, daquela cor, naquela amostra.

A quantidade de MEs em uma amostra (ME_{Am}) foi calculada multiplicando-se a fluorescência da amostra (f_{Am}) pelo F_c .

$$ME_{Am} = f_{Am} \times F_c$$

A partir dos valores de fluorescência obtidos, foram calculados os parâmetros hemodinâmicos, da maneira como se segue.

4.4.6 Fluxo sanguíneo regional - Q_o , ml/(min.g)

$$Q_o = (ME_{Am}/ME_{Ref}) \times (Q_{Ref}/P_{Am})$$

Em que ME_{Am} é a quantidade de MEs contidas na amostra, ME_{Ref} é a quantidade de MEs contidas na amostra sanguínea de referência, Q_{Ref} é o fluxo sanguíneo de referência (em ml/min) e P_{Am} é o peso da amostra.

O fluxo de referência é calculado dividindo-se o peso da amostra sanguínea de referência (P_{Am} , em g) pelo produto da densidade do sangue (1,06 g/ml) e o tempo de coleta da amostra (1,5 min).

$$Q_{Ref} = P_{Am}/1,06 \times 1,5$$

O cálculo do fluxo da veia porta foi feito indiretamente, a partir do fluxo arterial para o baço, pâncreas, mesentério, estômago e intestino. Como o volume das amostras era grande demais para serem colocadas em um tubo, os órgãos foram pesados individualmente, obtendo-se uma amostra, de cada um deles, equivalente a um quinto do seu peso. Essas amostras foram colocadas juntas em um tubo, a fluorescência foi medida, e o número de MEs calculado da mesma forma que nos outros tecidos. Multiplicando a quantidade de MEs contidas nesta amostra por 5, obteve-se o fluxo arterial total para este conjunto de órgãos, o equivalente ao fluxo da veia porta. Dividindo o fluxo da veia porta pelo peso do fígado (em g), obteve-se o fluxo venoso porta por grama de parênquima hepático.

4.4.7 Débito cardíaco - DC, ml/min

Calcula-se o DC multiplicando-se a razão dada pelo total de MEs injetadas no ventrículo esquerdo (ME_T) sobre o total de MEs contidas na amostra de sangue de referência ME_{Ref} pelo fluxo de referência (Q_{Ref}). Nesse caso ME_T é igual a 300.000.

$$DC = ME_T \cdot Q_{Ref} / ME_{Ref}$$

4.4.8 Índice cardíaco - IC, ml/(min.100g)⁻¹

O IC, em ratos, é calculado pelo produto de DC e pelo peso do animal (g) dividido por 100 (81-83).

$$IC = DC \cdot P/100$$

4.4.9 Considerações sobre o método de deposição de MEs

A opção do uso de MEs fluorescentes para determinação do fluxo tecidual se justifica porque o método fornece informações mais precisas e detalhadas do

que os sensores de fluxo, além de poder ser utilizado em pequenos animais, sem causar distúrbios hemodinâmicos (68).

Medidas acuradas da perfusão tecidual demandam mistura homogênea das MEs com o sangue arterial. As infusões de MEs, portanto, devem ser feitas dentro do átrio ou ventrículo esquerdo, e os aglomerados de MEs contidos nas preparações comerciais devem ser desfeitos imediatamente antes das injeções. Confirma-se a mistura adequada pela comparação do fluxo sanguíneo de cada rim do animal. Diferença de fluxo superior a 15% sugere mistura inadequada das MEs com o sangue, não permitindo análises confiáveis da perfusão tecidual (84). Outro determinante de acurácia é a quantidade de MEs por amostra, que deve ser superior a 400, a fim de garantir um erro relativo inferior a 5% (73, 85).

4.5 Análise estatística

A mortalidade global incluiu os animais mortos antes e após a alocação. A mortalidade por grupo foi computada entre os animais que sobreviveram aos primeiros 15 minutos de choque hemorrágico. A comparação da sobrevivência foi expressa em curva de sobrevivência (*Log rank*).

Utilizou-se teste t de Student para comparação entre as médias de dois grupos e análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para comparações entre médias de mais de dois grupos. Consideramos valor de p inferior a 0,05 como estatisticamente significativo.

Os resultados foram expressos em tabelas e figuras como médias \pm desvios-padrão (DP). Gráficos contendo médias e erros-padrão foram anexados. O modelo estatístico utilizado para o estudo foi:



Em que:

Y_{ij} = valor assumido para a variável em estudo no i-ésimo nível do fator combinação entre grupo e medida em estudo;

μ = efeito geral da média;

τ_i = efeito do i-ésimo nível do fator fixo (combinação entre grupo e medida);

ϵ_{ij} = erro aleatório.

Supôs-se que erros aleatórios ~~foram~~ foram independentes e identicamente dispostos com distribuição normal, média zero e variância constante. Foram feitas comparações múltiplas de Tukey quando observadas diferenças entre os níveis do fator, com intuito de detectar onde estas se encontravam.

Quando as variáveis não atenderam às suposições anteriores e nenhuma transformação aritmética pôde ser empregada com sucesso, a análise prosseguiu com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Peso dos animais

Os pesos médios dos animais dos grupos Simulado, SR, NT e HP (tabela 1) não foram diferentes entre os grupos.

Tabela 1 Peso dos animais.

Grupo	Simulado	SR	NT	HP
Peso	304 ± 30	298 ± 27	302 ± 27	292 ± 40

Valores em gramas (g) ± desvio-padrão.

ANOVA (p = 0,84).

5.2 Anestésicos

A quantidade de anestésicos administrada (tabela 2) foi semelhante e não houve diferença entre os grupos.

Tabela 2. Anestésicos

Anestésico	Simulado	SR	NT	HP
Cetamina	108,5 ± 10	122,3 ± 35	119,6 ± 30	113,1 ± 20
Xilazina	19,7 ± 2	19,4 ± 2	19,3 ± 3	20,5 ± 7

Valores em mg/kg, média ± desvio-padrão.

ANOVA (cetamina, p = 0,51; xilazina, p = 0,91)

5.3 Quantidade de cristaloides utilizada na reanimação

Os volumes médios de cristaloides necessários para atingir e manter a PAM proposta para cada grupo (tabela 3) foram maiores para o grupo NT do que para o grupo HP.

Tabela 3. Volume de cristaloides infundido durante os experimentos.

Grupo	NT	HP
RL	7,21 ± 3	2,45 ± 1

Valores em ml.100g⁻¹, média ± desvio-padrão

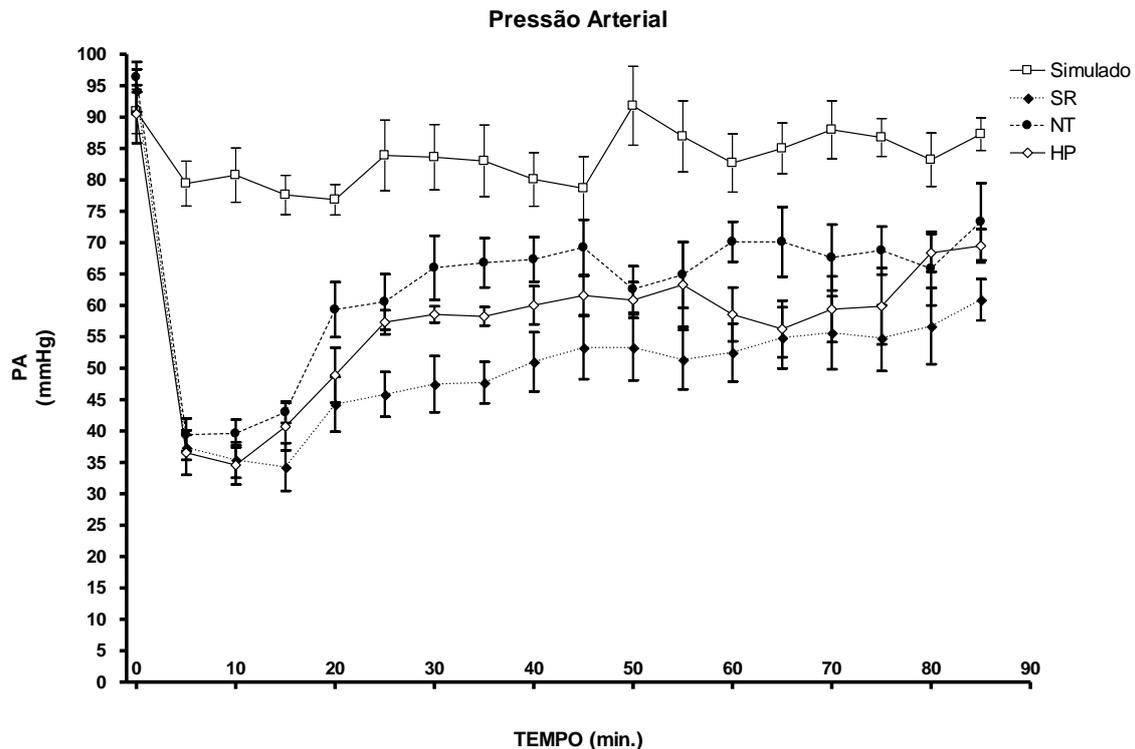
Teste t Student, p = 0,02.

5.4 Curvas de pressão arterial

A PAM basal não foi diferente entre todos os grupos (ANOVA, p > 0,05). Durante o período que antecedeu a reposição volêmica (T1), a queda da PAM não foi diferente entre os grupos SR, NT e HP (ANOVA, p > 0,05).

Após 15 min. de reanimação (de 30 a 85 min) foram observadas diferenças significativas entre todos os grupos (ANOVA com pós-teste de Tukey, p < 0,001).

As medidas de pressão arterial anotadas em intervalos de 5 minutos durante todo o experimento estão representadas na Figura 3.

Figura 3. Curvas de pressão arterial antes e após choque hemorrágico não controlado, em ratos.

Teste comparativo ANOVA com pós-teste de Tukey:

* sem diferenças significativas entre os grupos

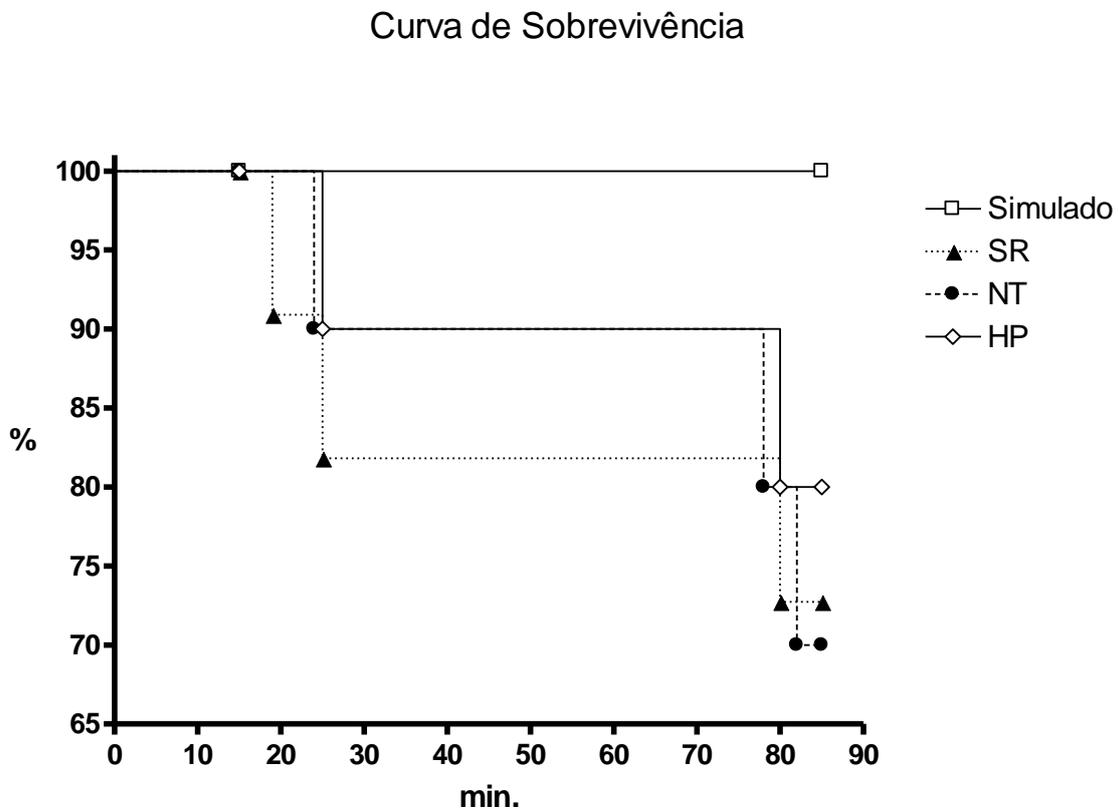
† $p > 0,05$ SR vs NT, SR vs HP, NT vs HP

§ diferenças significativas entre todos os grupos ($p < 0,001$).

O grupo Simulado apresentou PAM pouco menor ao valor inicial, com pico pressórico por volta dos 50 min.

5.5 Mortalidade

Quinze animais morreram durante os 45 experimentos (33,3%). Sete animais (15,5%) morreram nos primeiros 15 minutos após a lesão aórtica, antes do início da reanimação volêmica e foram substituídos. Dentre os animais que sobreviveram aos primeiros 15 minutos de CH, a mortalidade foi de 3/11 (27%) no grupo SR, 3/10 no grupo NT (30%) e 2/10 (20%) no grupo HP. Todos os sete animais do grupo Simulado sobreviveram até o fim dos experimentos. A figura 4 ilustra as curvas de sobrevivência. Não houve diferença na mortalidade entre os grupos submetidos a CH.

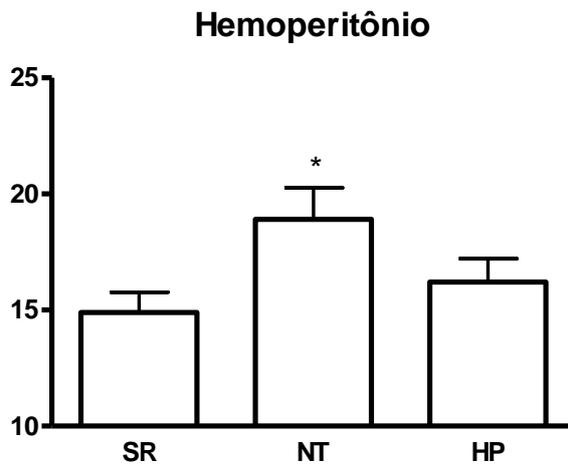
Figura 4. Curva de sobrevivência (Log rank) no choque hemorrágico não controlado, em ratos.

O eixo "X" se refere ao intervalo entre T0 e a morte. O eixo "Y" indica o percentual de animais vivos correspondente em cada ponto no tempo. A mortalidade para cada grupo foi computada depois da aleatorização, ao término de T1 (15 minutos) ($p = 0,49$).

5.6 Hemoperitônio

Constatou-se maior perda sanguínea no grupo NT ($18,80 \pm 3,5$ ml/kg) comparada à dos grupos HP ($16,24 \pm 3,9$ ml/kg) e SR ($14,89 \pm 3,2$ ml/kg, $p = 0,04$). A Figura 5 ilustra os volumes de hemoperitônio, mensurados pela diferença de peso entre gazes secas e aquelas encharcadas de sangue e coágulos evacuados da cavidade abdominal dos animais no final dos experimentos.

Figura 5. Volumes de hemoperitônio após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (ml/kg) representam as médias com erros-padrão das médias.
* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p = 0,04$ vs SR.

5.7 Débito cardíaco e índice cardíaco

Ambos foram maiores na medida controle (Cntrl, em T0) em relação a todos os grupos (tabela 4, figuras 6 e 7), exceto ao grupo Simulado. Apesar do DC e IC médios serem maiores no grupo Simulado, não houve diferença estatisticamente significativa. O tipo de reanimação (NT ou HP) não alterou o DC e o IC dos animais submetidos à CH.

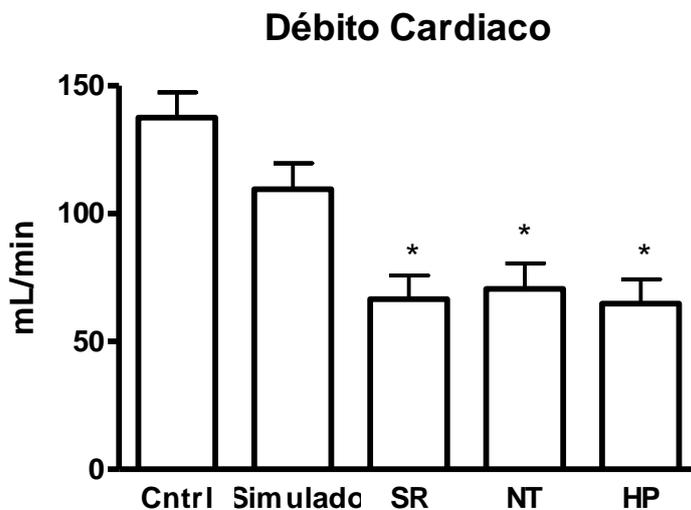
Tabela 4. Valores médios de débito cardíaco e índice cardíaco antes após choque hemorrágico não controlado, em ratos.

Grupo	DC	IC
Cntrl	137,5 ± 55	41,9 ± 15
Simulado	109,6 ± 24	36,7 ± 7
SR*	66,6 ± 27	21,9 ± 9
NT*	70,6 ± 26	24 ± 10
HP*	64,8 ± 30	22,6 ± 11

Valores de débito cardíaco (DC, ml.min⁻¹) ± desvio-padrão e índice cardíaco (IC, ml.min⁻¹.100g⁻¹) ± desvio-padrão.

* ANOVA com pós-teste de Tukey, p < 0,001 vs Cntrl.

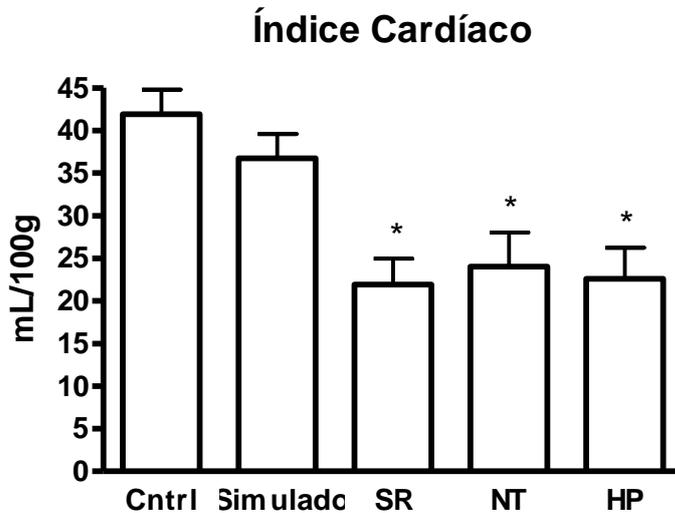
Figura 6. Valores de débito cardíaco antes após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (ml.min⁻¹) representam médias com erros-padrão das médias.

* ANOVA com pós-teste de Tukey, p < 0,05 vs Cntrl.

Figura 7. Valores de índice cardíaco antes após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$) representam médias com erros-padrão das médias.

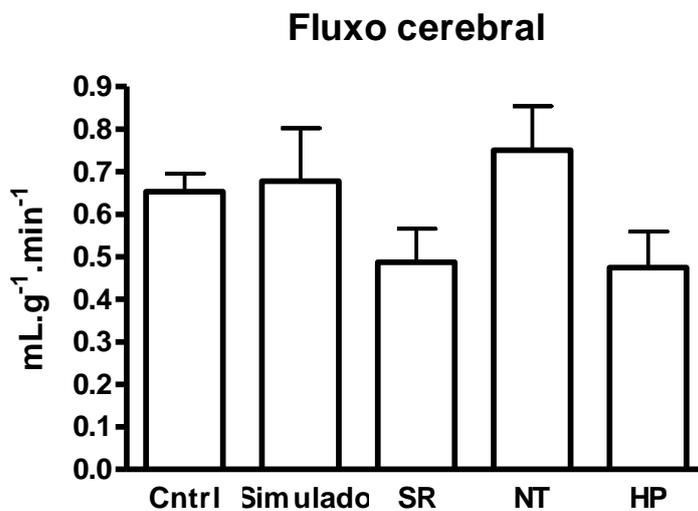
* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ vs Cntrl.

5.8 Perfusão tecidual

O fluxo sanguíneo regional (Q0) foi calculado em vários órgãos. As diferenças de fluxo sanguíneo cerebral e coronariano entre os grupos não mostraram significância estatística (ANOVA, $p > 0,05$) (figuras 8 e 9).

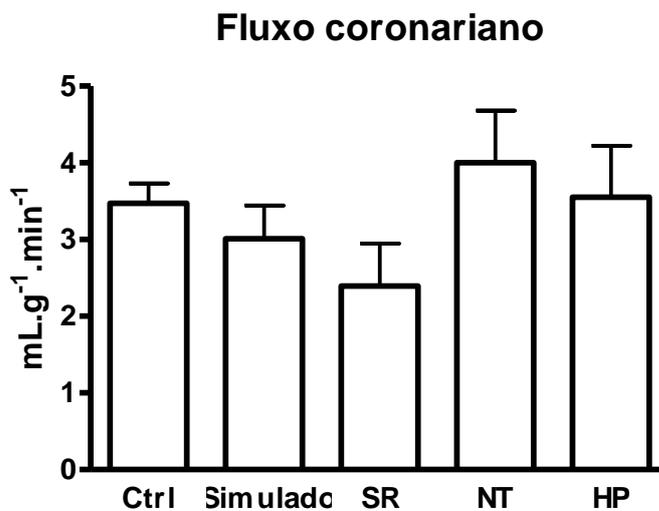
Observou-se tendência dos grupos NT e HP a possuírem fluxo coronariano superior aos outros grupos. Os grupos Cntrl e Simulado tiveram fluxos intermediários e o grupo SR teve 2 animais com perfusão cardíaca superior a $4,8 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, enquanto 4 ratos apresentaram fluxos inferiores a $1,3 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Figura 8. Fluxos cerebrais após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (mL.g⁻¹.min⁻¹) representam médias com erros-padrão das médias.

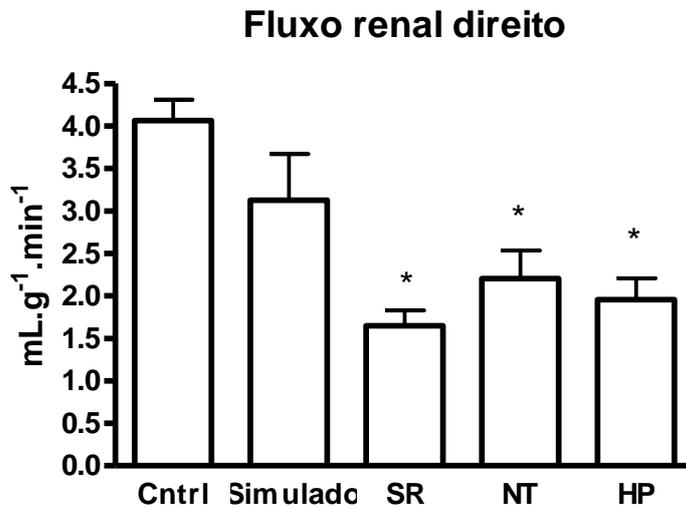
Figura 9. Fluxos coronarianos após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (mL.g⁻¹.min⁻¹) representam médias com erros-padrão das médias.

O fluxo renal (figuras 10 e 11) foi maior nos grupos Cntrl e Simulado, havendo significância nas diferenças entre o grupo Cntrl vs SR, NT e HP (ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). As diferenças de fluxo entre o rim esquerdo e direito foram pequenas e sem significância (ANOVA, $p > 0,05$), variando entre 4 % e 12 %. A presença de reanimação volêmica (normotensiva ou hipotensiva) não alterou a perfusão renal de forma significativa.

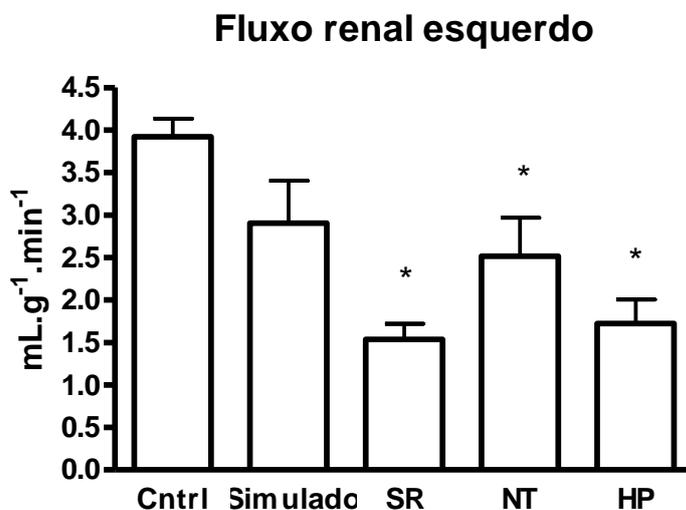
Figura 10. Fluxos renais direitos após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (ml.g⁻¹.min⁻¹) representam médias com erros-padrão das médias.

* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ vs Cntrl.

Figura 11. Fluxos renais esquerdos após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (ml.g⁻¹.min⁻¹) representam médias com erros-padrão das médias.

ANOVA com pós-teste de Tukey:

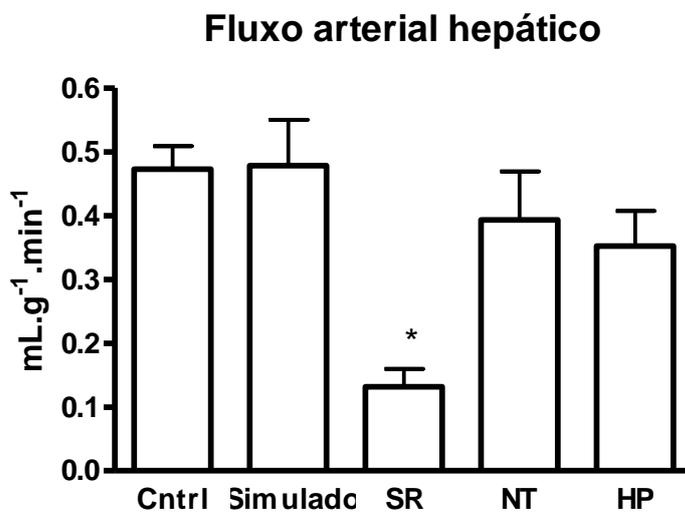
* $p < 0,05$ vs Cntrl.

As proporções de fluxo arterial hepático (figura 12) e venoso porta (figura 13) mantiveram-se constantes em todos os grupos (ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). O fluxo arterial hepático respondeu por $29,92\% \pm 10,03\%$ do fluxo hepático total no grupo Cntrl, por $33,12\% \pm 11,75\%$ no grupo Simulado, por $29,46\% \pm 14,23\%$ no grupo NT, e por $33,75\% \pm 11,65\%$ no grupo HP.

O fluxo arterial hepático do grupo SR foi menor em relação aos grupos Cntrl, Simulado e NT. O fluxo porta no grupo SR também foi menor em relação ao grupo Cntrl.

O fluxo hepático (arterial e porta) nos grupos HP e NT mantiveram-se próximos ao nível basal, sem diferença entre ambos.

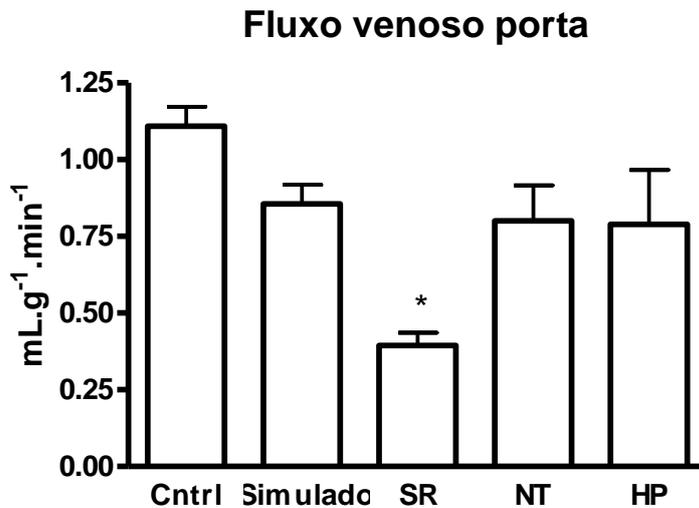
Figura 12. Fluxos arteriais hepáticos após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (mL.g⁻¹.min⁻¹) representam médias com erros-padrão das médias.

* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ vs Cntrl, Simulado e NT.

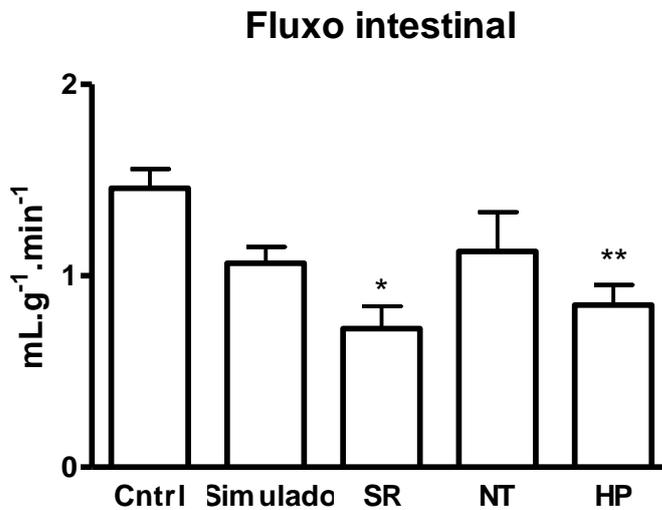
Figura 13. Fluxos venosos porta hepáticos após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (ml.g⁻¹.min⁻¹) representam médias com erros-padrão das médias.

* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ vs Cntrl.

O grupo SR teve o menor fluxo intestinal entre todos os grupos (figura 14), com significância em relação aos grupos Cntrl e Simulado. Os fluxos do grupo HP também foram menores em relação ao grupo Cntrl, mas não houve diferença em relação à NT. Este apresentou fluxo médio semelhante ao grupo Simulado e, como neste, sem diferença comparada ao grupo Cntrl.

Figura 14. Fluxo intestinal após choque hemorrágico não controlado, em ratos.

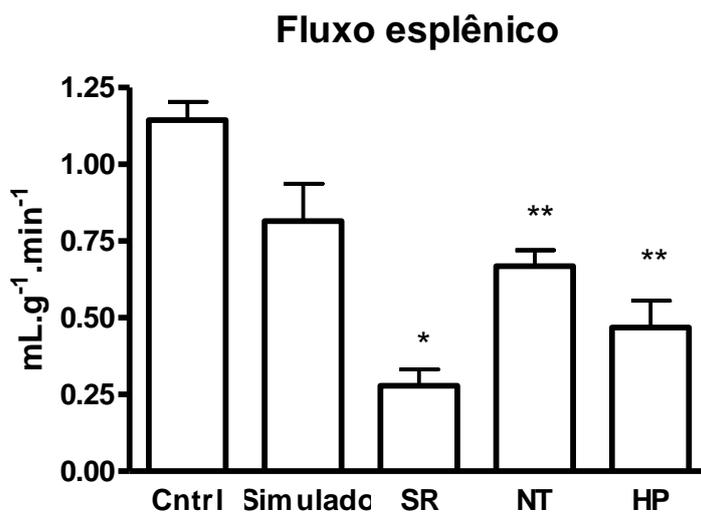
Os valores (mL.g⁻¹.min⁻¹) representam médias com erros-padrão das médias.

ANOVA com pós-teste de Tukey:

* p < 0,05 vs Cntrl e Simulado

** p < 0,05 vs Cntrl

O grupo SR teve o menor fluxo esplênico entre todos os grupos (figura 15), com significância em relação aos grupos Cntrl e Simulado. Os fluxos dos grupos NT e HP também foram menores em relação ao grupo Cntrl. Não houve diferença no fluxo esplênico entre HP e NT.

Figura 15. Fluxos esplênicos após choque hemorrágico não controlado, em ratos.

Os valores (mL.g⁻¹.min⁻¹) representam médias com erros-padrão das médias.

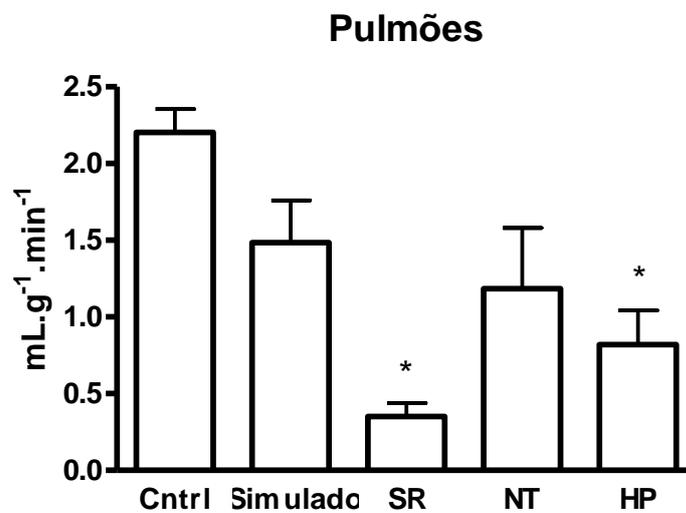
ANOVA com pós-teste de Tukey:

* p < 0,05 vs Cntrl e Simulado

** p < 0,05 vs Cntrl

O fluxo das artérias brônquicas (figura 16) variou entre os animais, o que elevou o desvio-padrão. Foram excluídos da análise 7 registros do grupo Cntrl, 1 do grupo Simulado, 2 do grupo SR e 1 do grupo NT, cujos valores de fluxo foram superiores a 2,5 vezes o valor da média para o grupo. O grupo Cntrl teve maior média de fluxo, com significância em relação aos grupos SR e HP. Não houve diferença no fluxo das artérias brônquicas entre HP e NT.

Figura 16. Fluxos das artérias brônquicas após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (mL.g⁻¹.min⁻¹) representam médias com erros-padrão das médias.

* Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p < 0,05$ vs Cntrl

As médias de fluxo sanguíneo regional, juntamente com seus respectivos desvios-padrão estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Medidas de fluxo sanguíneo regional antes e após choque hemorrágico não controlado, em ratos.

Fluxo	Cntrl*	Simulado	SR	NT	HP
Cer	0,65 ± 0,2	0,68 ± 0,3	0,49 ± 0,2	0,75 ± 0,3	0,47 ± 0,2
Cor	3,47 ± 1,4	3,01 ± 1,1	2,39 ± 1,7	4,00 ± 1,8	3,55 ± 1,9
RD**	4,06 ± 1,4	3,12 ± 1,3	1,64 [§] ± 0,5	2,2 [§] ± 0,8	1,95 [§] ± 0,7
RE	3,92 ± 1,2	2,90 ± 1,2	1,53 [§] ± 0,5	2,51 [§] ± 1,1	1,72 [§] ± 0,8
AH	0,47 ± 0,2	0,48 ± 0,2	0,13 ^{§†} ± 0,1	0,39 ± 0,2	0,35 ± 0,2
VP	1,11 ± 0,3	0,85 ± 0,1	0,39 [§] ± 0,1	0,80 ± 0,3	0,79 ± 0,5
Int	1,45 ± 0,6	1,07 ± 0,2	0,72 [§] ± 0,4	1,12 ± 0,5	0,85 ± 0,3
Baço	1,14 ± 0,3	0,81 ± 0,3	0,28 ^{§e} ± 0,1	0,67 [§] ± 0,1	0,47 [§] ± 0,2
AB	2,20 ± 0,8	1,48 ± 0,7	0,35 [§] ± 0,2	1,18 [§] ± 1	0,82 [§] ± 0,6

Médias ± desvios-padrão das médias. Cer, cérebro; Cor, coração; RD, rim direito; RE, rim esquerdo; AH, artéria hepática; VP, veia Porta; Int, intestino; AB, artérias brônquicas.

* o grupo Cntrl se refere aos valores de perfusão pré-choque

** valores semelhantes aos do rim contralateral ($p > 0,05$)

ANOVA com pós-teste de Tukey:

§ $p < 0,05$ vs Cntrl.

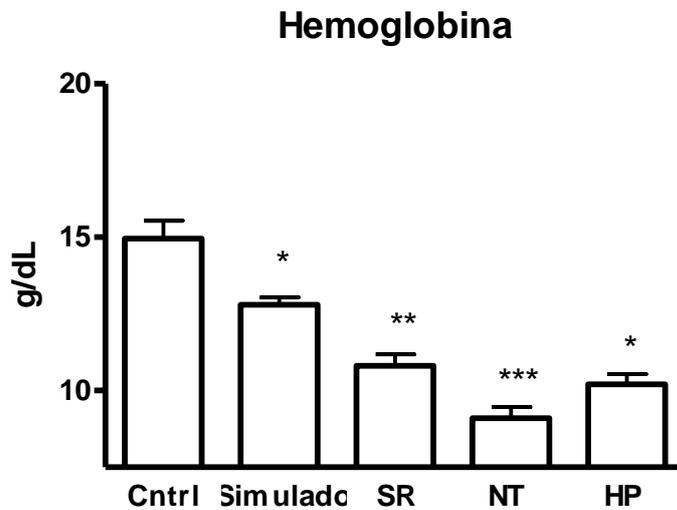
e $p < 0,05$ vs Simulado.

† $p < 0,05$ vs NT.

5.9 Exames Laboratoriais

Os níveis de hematócrito e hemoglobina foram menores em todos os grupos em relação aos controles. Dos animais submetidos à CH, o grupo SR foi o que apresentou menor queda, com significância em relação ao grupo NT (Figura 17).

Figura 17. Níveis de hemoglobina após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (g/dl) representam médias com erros-padrão das médias.

ANOVA com pós-teste de Tukey:

* $p < 0,05$ vs Cntrl.

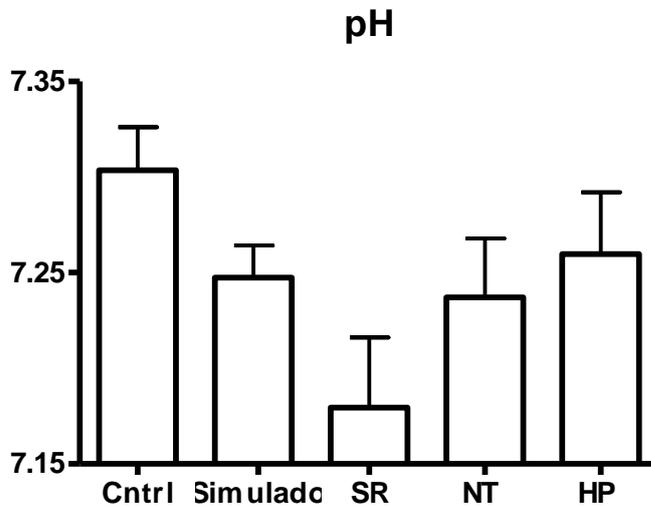
** $p < 0,05$ vs Cntrl e Simulado

*** $p < 0,05$ vs Cntrl, Simulado e SR

A contagem de plaquetas teve desvio-padrão alto e variância diferente entre os grupos. Foi, portanto, aplicado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Observou-se queda ($p < 0,05$) apenas dos grupos NT e HP em relação ao Cntrl (tabela 6).

Os valores de pH, PO_2 , bicarbonato e excesso de bases, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$).

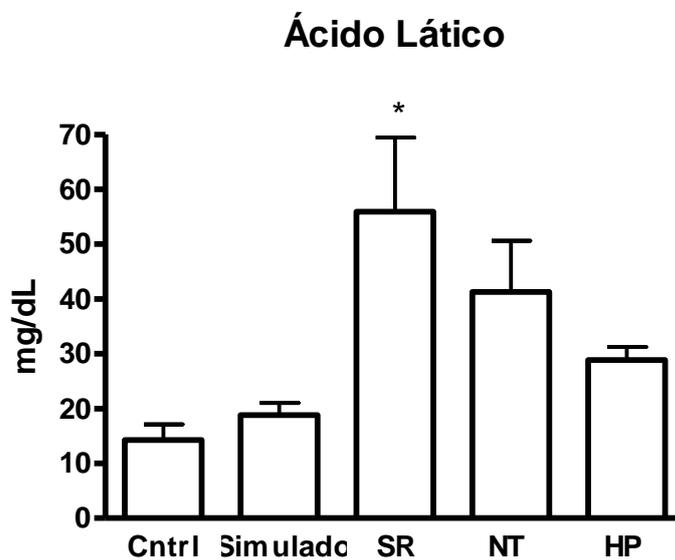
Figura 18. Níveis de pH após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores representam médias com erros-padrão das médias.

O grupo SR teve os maiores níveis de ácido láctico ao final dos experimentos (figura 23), com significância em relação a todos os outros.

Figura 19. Níveis de ácido láctico após choque hemorrágico não controlado, em ratos.



Os valores (mg/dl) representam médias com erros-padrão das médias.

ANOVA com pós-teste de Tukey:

* $p < 0,05$ vs Cntrl.

Não houve diferença significativa entre os grupos NT e HP.

Os resultados dos hemogramas e gasometrias arteriais, por grupo, estão expostos na tabela 6.

Tabela 6. Exames laboratoriais após choque hemorrágico não controlado, em ratos.

	Cntrl	Simulado	SR	NT	HP
Htc	41,55 ± 3,4	32,26 [§] ± 2,9	30,83 [§] ± 3	24,91 ^{§e†} ± 4	28,64 [§] ± 2,9
Hb	14,95 ± 1,4	12,80 [§] ± 0,5	10,80 ^{§e} ± 1,1	9,09 ^{§e†} ± 1,2	10,31 ^{§e} ± 0,7
Plq⁺	623 ± 111	546 ± 87	993 ± 157	447 [#] ± 185	419 [#] ± 71
pH	7,30 ± 0,04	7,25 ± 0,03	7,18 ± 0,1	7,24 ± 0,1	7,26 ± 0,1
PO₂	99,5 ± 14,8	114,2 ± 21,6	89,41 ± 23,4	100,38 ± 24,1	125,39 ± 26,4
PCO₂	44,52 ± 7,7	46,90 ± 6,6	43,83 ± 10,1	46,05 ± 9,2	36,84 ± 8,1
HCO₃⁻	21,75 ± 5,1	19,65 ± 1,7	16,69 ± 3,6	20,13 ± 4,2	16,49 ± 2,1
BE	-4,62 ± 4,8	-6,40 ± 1,4	-10,21 ± 4,7	-6,54 ± 4	-9,59 ± 2,8
AL	14,26 ± 7,5	18,82 ± 4,4	55,91 [§] ± 35,8	41,27 ± 29,5	28,81 ± 8

Hemogramas e gasometrias arteriais. Médias ± desvio-padrão. Htc, hematócrito; Hb, hemoglobina; Plq, contagem de plaquetas; HCO₃⁻, bicarbonato; BE, excesso de bases; AL, ácido láctico.

* (Valores das médias e DP) x 10³

ANOVA com pós-teste de Tukey:

§ p < 0,05 vs Cntrl.

e p < 0,05 vs Simulado

† p < 0,05 vs SR

Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn

p < 0,05 vs Cntrl

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Considerações sobre o método

6.1.1 Modelo animal de choque hemorrágico

Apesar de a maioria dos estudos sobre reanimação no choque hemorrágico não controlado mostrar que a HP reduz a hemorragia (12-14, 31-46, 86, 87), há controvérsias sobre a ocorrência de hipoperfusão tecidual com essa estratégia. A hipoperfusão tecidual apresenta relação direta com a sobrevivência de vítimas de trauma grave. Essa correlação parece ser mais significativa do que o volume de sangue perdido ou a repercussão hemodinâmica da hemorragia (88).

Modelos experimentais clinicamente relevantes de CH e reanimação volêmica devem incorporar hemorragia não controlada grave e lesão tecidual (16). Idealmente, o modelo deve simular diversos graus de gravidade do choque e reproduzir os tempos decorridos entre o acidente e o tratamento, tais como: chegada do socorro ao local, transporte da vítima até o centro de trauma pelas equipes médicas de emergência (89). Já a reposição volêmica deve simular as modalidades terapêuticas vigentes, como a reposição normotensiva e hipotensão permissiva.

No presente trabalho, a reanimação volêmica foi iniciada 15 minutos após a lesão da aorta, simulando o tempo médio gasto, confirmado na prática, entre o trauma e a chegada dos sistemas de resgate. Em estudo conduzido em Belo Horizonte, MG entre 2006 e 2009 (90), o tempo médio decorrido entre a ligação telefônica e a chegada da equipe do SAMU (Serviço de Atendimento Móvel de Urgência) ao local do evento foi de 20,21 min. (intervalo de confiança de 95 %, entre 20,72 e 21,71 min.), com a maior parte das ocorrências entre 10 e 20 min. Em eventos extremos, como ferimentos penetrantes no tronco associados a CH, o tempo médio de deslocamento e início da reanimação volêmica ocorre, via de regra, em torno de 15 minutos, tempo praticado no presente estudo.

O modelo de CH com lesão vascular intra-abdominal e laparotomia foi utilizado com intuito de associar trauma tecidual à hemorragia grave não controlada e por ser possível indicação para uso de HP (8, 35). A transfixação da aorta com agulha de 25 G foi utilizada por ser método simples e provocar lesão com tamanho padronizado (42, 44, 45). O fechamento da laparotomia permitiu que os efeitos da pinça abdominal sobre a hemostasia também fossem simulados.

6.1.2 Uso da heparina

Nos experimentos-piloto os parâmetros hemodinâmicos foram monitorados por meio de cânulas de polietileno PE-50 sem heparina. Entretanto, as frequentes obstruções das cânulas por coágulos tornavam necessárias injeções repetidas de soro nas mesmas. Esse inconveniente foi contornado com o preenchimento destas com heparina diluída, evitando, além das obstruções, interferir sobre o volume da reanimação. Todos os animais receberam quantidade semelhante de heparina na concentração de 1,7 U.I./ml ou 5 U.I./IV por animal, o que equivale à injeção menor que 2000 U.I. em homem adulto, incapaz de provocar alteração significativa na coagulação normal.

Outros estudos experimentais com MEs em ratos utilizam doses muito maiores (600 UI/kg ou 150 a 200 UI por animal) para prevenir obstrução das cânulas por coágulos (85, 91). Como a dose utilizada no presente experimento foi muito inferior a essas, é provável que a heparina não tenha influenciado a coagulação. Ademais, todos os animais receberam essa dose de heparina, o que uniformiza os grupos nesse aspecto.

6.1.3 Anestésicos

A associação de cetamina com xilazina foi utilizada com o objetivo de reduzir distúrbios hemodinâmicos fármaco-dependentes. A cetamina tem ação simpatomimética, aumentando a pressão arterial, o débito cardíaco e a resistência vascular sistêmica, além de induzir espasmos musculares. A xilazina, por sua vez,

antagoniza estes efeitos por ser miorreaxante e por reduzir o débito cardíaco e a frequência cardíaca (92). Ambas as drogas possuem meia-vida curta, e a maior parte da dose foi utilizada para a indução anestésica e para o ato operatório, reservando-se baixas doses suplementares durante registro hemodinâmico, conforme a demanda.

6.2 Pressão arterial

A hemorragia provocada pela lesão da aorta causou queda da PAM superior a 60% dos valores basais, sem diferença significativa entre os grupos SR, NT e HP. As curvas pressóricas dos animais submetidos à lesão da aorta são semelhantes, com tendência a se confundirem após 50 minutos da lesão. Infusão de grandes volumes de RL no grupo NT recupera a PAM, mas segue-se novo período de hipotensão. Portanto, a recuperação é parcial. Esse achado sugere choque refratário. A curva pressórica do grupo HP manteve-se estável durante este período. A partir de 75 minutos, observou-se tendência ascendente, sugerindo mecanismo de “ressuscitação endógena” por meio da mobilização de fluidos dos espaços intersticial e intracelular para o intravascular (89). Achado semelhante foi observado no grupo SR, coincidindo com outros estudos (10, 34, 36, 37, 41, 42, 86, 93, 94).

No CH grave, fluidos como RL só são capazes de sustentar a PAM à custa de infusões rápidas e contínuas. Em voluntários saudáveis, verificou-se que apenas 16% do volume de cristaloides infundidos permanecem no espaço intravascular após 30 minutos (95). Na vigência de CH, o extravasamento de fluidos através dos capilares para o interstício é ainda maior. A reanimação volêmica desencadeia o fenômeno de isquemia-reperfusão, que ativa leucócitos e aumenta a síntese de mediadores inflamatórios e radicais livres derivados do oxigênio, aumentando a permeabilidade capilar. O extravasamento aumenta na proporção que a restauração da pressão arterial distende os capilares reperfundidos (96).

6.3 Mortalidade

A mortalidade geral do presente estudo foi de 34,09%. Em humanos, a mortalidade global relacionada ao CH é muito variável, oscilando entre 30% e 54%, dependendo da amostra estudada. No estudo com maior índice de mortalidade, em humanos, o percentual de óbitos foi de 31% nas duas primeiras horas, 12% no decorrer das primeiras 24h e 11% ao longo da internação hospitalar (97).

No presente estudo, entre os treze animais com queda da PA inferior a de 30 mmHg após a lesão, quatro (31%) morreram nos primeiros 15 minutos e outros três (23%) entre 15 e 25 minutos do experimento, independentemente do tipo de reanimação utilizado.

A comparação dos resultados da presente pesquisa com outros estudos experimentais de CH deve ser interpretada com cautela, pois os modelos apresentam variações quanto:

- Aos métodos de indução do CH não controlado - lesão arterial (13, 37, 41, 44-46, 51, 86, 94), venosa (34), combinada (60, 98), secção da cauda (14), lesão de órgão sólido (99) e associação de CH controlado e não controlado (13, 14, 37, 41, 45).
- Às formas de reanimação - tipo de solução utilizada (46, 60, 86), volume (34, 36, 45, 86, 94), velocidade de infusão (51, 86), intervalo entre o CH e início da reanimação (36, 51, 99), duração da reanimação e PAM-alvo (13, 14, 41, 44, 45, 51, 60, 98, 99).
- Aos tipos de dados analisados e os momentos em que são coletados.

Neste estudo, a sobrevivência do grupo SR foi de 73%. Outros estudos de CH em animais com o mesmo tipo de lesão, sem reanimação, mostraram sobrevivência de 22% a 37,5% dos animais (42, 44, 45). Como a duração do período de CH nesses experimentos foi de 120 a 180 minutos, é possível que a maior mortalidade esteja relacionada ao tempo de experimento. Se o tempo de

observação do presente estudo fosse estendido para duas a três horas, é possível que a hipoperfusão tecidual resultasse em aumento da mortalidade no grupo SR.

6.4 Perda sanguínea

Os grupos SR e HP tiveram menor perda sanguínea e valores mais altos de hemoglobina e contagem de plaquetas. A maior parte dos estudos de CH não controlado demonstrou perda sanguínea mais significativa nos grupos submetidos à reanimação com grandes volumes de cristaloides comparados aos grupos que receberam menor volume (10, 13, 14, 34, 36, 37, 41, 43-45, 99). No presente trabalho, houve queda significativa nos valores do hematócrito em todos os grupos comparados ao grupo Cntrl. O grupo NT teve os menores valores de hematócrito e hemoglobina, com significância em relação aos grupos Simulado e SR. Esses resultados foram semelhantes aos de outros estudos (10, 37, 44, 98).

6.5 Resposta hemodinâmica e perfusão tecidual

No presente estudo não houve diferença significativa entre os valores de pH, bicarbonato, BE e ácido láctico dos grupos HP e NT. Esses achados demonstram que os benefícios da HP sobre a hemostasia ocorrem sem comprometer a perfusão tecidual. Esses dados estão de acordo com a literatura (10, 37, 42, 86, 99). No entanto, níveis de BE e lactato possuem forte correlação com mortalidade em humanos (100-112).

O DC e o IC observados nos animais do grupo controle foram maiores do que nos animais do grupo Simulado. Além disso, os valores basais de IC também foram maiores do que aqueles descritos em outros trabalhos. Atribuímos essas diferenças, em parte, ao efeito da utilização da cetamina como anestésico e o pequeno tempo decorrido entre a injeção desta droga e a aferição do DC (34, 84, 113-123). Estudos utilizando MEs radioativas em ratos normovolêmicos

anestesiados com cetamina identificaram aumento do DC de até 38% em relação a animais não anestesiados (118, 121).

Chama a atenção o fato de a reposição volêmica NT ou HP não provocar diferença significativa no DC e no IC dos animais em CH. Portanto, a HP traz benefícios para a hemostasia e não compromete o desempenho cardíaco de animais em CH.

Corroborando esses dados há estudos demonstrando que pequenos aumentos da PAM podem induzir a grandes aumentos no DC. Em modelo de CH não controlado, o aumento da PAM 10 a 15 mmHg acima dos valores pós-hemorragia resultou em incrementos no DC superiores a 50% , mantendo-os próximos aos valores pré-choque (37).

6.5.1 Fluxo Cerebral

Os fluxos cerebrais dos grupos Cntrl e Simulado foram semelhantes aos encontrados na literatura (124). Houve queda pouco significativa do fluxo em todos os grupos com relação aos controles e pouca variação entre os demais grupos. Todos apresentaram fluxos próximos aos valores normais.

A resistência vascular cerebral (RVC), ao contrário da resistência vascular sistêmica, diminui no CH. O mesmo ocorre quando o consumo de oxigênio aumenta. Dessa forma, o fluxo sanguíneo é desviado para o encéfalo a fim de manter a perfusão cerebral na proporção em que o débito cardíaco cai. Nesse caso, razão DC/RVC pode chegar a 150% dos valores normais na hemorragia grave (125). É importante lembrar que esse mecanismo possui duração limitada, mantendo perfusão próxima do normal durante os primeiros 30 min., caindo mais de 50% após 90 min. (124). Essa queda do fluxo pode ser atribuída ao aumento dos níveis de endotelina-1, potente vasoconstritor produzido pelo endotélio vascular em resposta ao choque prolongado.

Além destes mecanismos, o fluxo cerebral é influenciado pelo seu metabolismo e pelos níveis de O₂ e CO₂ arteriais. O aumento do consumo de oxigênio e glicose nos centros vasomotores encefálicos e a hiperventilação que

se seguem à hemorragia também contribuem para a queda da RVC e aumento do fluxo cerebral. A hipóxia e a hipercapnia dilatam os vasos cerebrais, enquanto a hipocapnia é vasoconstritora. Alterações destes componentes podem produzir variações de fluxo de até 10 vezes (126). A ligadura unilateral da carótida, feita em todos os experimentos, pode ter comprometido parcialmente estes reflexos, além de ter exacerbado o efeito protetor do fluxo cerebral por meio da diminuição da resistência vascular cerebral (127).

6.5.2 Fluxo Cardíaco

O fluxo cardíaco foi semelhante entre os grupos, provavelmente devido à liberação local de vasodilatadores produzidos conforme a demanda metabólica do coração. Entre eles, destacam-se a adenosina, CO₂, histamina e íons hidrônio e potássio (17).

Em resposta à hipovolemia há aumento da frequência cardíaca e, conseqüentemente, maior gasto energético, aumentando o consumo de oxigênio e estimulando a produção local de vasodilatadores. Esses, por sua vez, aumentam o fluxo coronariano, de forma semelhante ao que ocorre com o fluxo cerebral (17).

No presente estudo, a reanimação normotensiva não resultou em aumento no DC e IC em comparação às outras estratégias, confirmando resultados de estudos anteriores, que a reanimação supranormal com objetivo de normalizar esses parâmetros não resultou em aumento da oferta de oxigênio aos tecidos (88, 128).

6.5.3 Fluxo Renal

A perfusão renal diminuiu de forma acentuada nos três grupos submetidos à CH. A reanimação com RL, seja hipotensiva ou normotensiva, não melhorou o fluxo renal. No presente estudo, a concordância entre os fluxos dos

rins direito e esquerdo entre os grupos demonstra que o método de microesferas é confiável para avaliar a perfusão tecidual.

O fluxo renal é um dos mais precocemente comprometidos pela isquemia no CH. No CH, o fluxo renal permanece comprometido, a despeito da reanimação volêmica e da normalização da PAM e do DC, conforme relatado em outros estudos (34, 94, 129).

Apesar de o débito urinário ser considerado marcador do estado da perfusão renal e sistêmica, ele é pouco sensível (9). A rápida expansão do volume intravascular inibe a secreção de vasopressina e aldosterona, diminuindo a reabsorção renal de sódio e água e aumentando o débito urinário sem que haja concomitante normalização da perfusão renal e sistêmica. Em estudo de CH controlado, a reanimação volêmica foi capaz de restabelecer a perfusão renal nos primeiros minutos após o início da infusão. No entanto, o fluxo não foi sustentado por períodos superiores a uma hora (130). Como a autorregulação do fluxo sanguíneo é mecanismo importante, pode-se supor que a redistribuição do fluxo sanguíneo possa ser, pelo menos em parte, devida à secreção de vasodilatadores locais em resposta à queda na oferta de oxigênio ao parênquima renal (128).

6.5.4 Fluxo Mesentérico, hepático e esplênico

No CH a perfusão mesentérica é reduzida de forma mais intensa do que a perfusão do coração e do cérebro. Um dos motivos para essa redução é o aumento acentuado da resistência vascular mesentérica. A vasoconstrição mesentérica responde por aproximadamente 40% do aumento da resistência vascular sistêmica no CH. Um dos mecanismos envolvidos nessa vasoconstrição exacerbada é a afinidade da musculatura lisa arteriolar mesentérica à angiotensina durante o CH. Esta afinidade pode aumentar em até cinco vezes em comparação à musculatura lisa de outros leitos vasculares (131).

A disfunção endotelial provocada pela redução da perfusão mesentérica resulta em influxo e ativação de neutrófilos (96, 132). Além disso, o intestino diminui o consumo de oxigênio em resposta à queda do fluxo tecidual, aumentando o risco de translocação bacteriana e produção de endotoxinas. Essa

vulnerabilidade do intestino à isquemia é causa importante de falência múltipla de órgãos (128).

O fluxo sanguíneo intestinal foi menor no grupo SR em relação aos demais. Não houve diferença significativa na perfusão intestinal entre os grupos HP e NT. Há evidências semelhantes na literatura, nas quais a reanimação agressiva com cristaloides não melhorou ou até piorou o fluxo intestinal em comparação à reanimação controlada ou mesmo à ausência de reanimação (34, 99).

No presente estudo, a perfusão hepática, arterial e porta não teve alteração significativa entre os grupos HP e NT. No grupo SR, houve redução significativa da perfusão hepática. Esse processo, se prolongado, provoca lesão orgânica por meio do aumento da ornitina carbamoiltransferase (34, 133).

Como era de se esperar, as alterações no fluxo esplênico foram semelhantes às do fluxo arterial hepático, com queda acentuada no grupo SR em relação aos grupos Cntrl e Simulado. Hipofluxo esplênico após o CH também foi demonstrado em outro estudo, com redução de 75% mesmo após a reposição volêmica (134).

6.5.5 Fluxo das artérias brônquicas

A perfusão pulmonar pelas artérias brônquicas representa apenas 1 a 2% do DC e é responsável pela vascularização arterial dos brônquios e tecidos de sustentação dos pulmões (17).

A grande variação do fluxo brônquico entre grupos e entre indivíduos do mesmo grupo requereu a aplicação de teste estatístico não paramétrico (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn) para avaliar as diferenças entre os grupos. Como ocorrem *shunts* arteriovenosos, especialmente em animais em choque, MEs da circulação sistêmica podem alcançar a circulação pulmonar pela artéria pulmonar, interferindo na confiabilidade dos resultados entre os grupos. A análise comparativa dos dados ficou prejudicada pela falta de outros estudos com os quais nossos pudessem ser comparados.

6.6 Limitações do estudo

O presente estudo possui limitações referentes ao modelo experimental de CH, ao método de deposição de MEs e outras limitações inerentes a modelos com pequenos animais.

Modelos de CH em ratos, apesar das vantagens referentes aos custos com materiais e logística, trazem alguns inconvenientes. A necessidade de heparinização das cânulas e infusão de cristaloides, mesmo no grupo SR, pode ter mascarado efeitos deletérios mais sutis da hipovolemia nesse grupo. Já a utilização de heparina, mesmo em baixas doses, pode ter potencializado os distúrbios de coagulação após o choque. Além disso, a resposta hemodinâmica de pequenos animais não é igual à de humanos, e o baixo volume de sangue limita a coleta de amostras.

O presente estudo restringiu-se a investigar a perfusão dos órgãos apenas na fase aguda do CH (85 minutos), mas sabe-se que os estados de choque provocam alterações tardias que podem resultar em falência orgânica múltipla. Não foi objetivo do presente trabalho estudar as alterações do CH, o que não afasta a possibilidade de pesquisas futuras para estudar os aspectos tardios do CH. O modelo descrito nesse estudo procurou contemplar os eventos temporais que ocorrem até o controle cirúrgico da hemorragia em vítimas de traumas penetrantes no tronco.

Finalmente, o método das MEs se limita a estudar o estado perfusional dos órgãos, mas não avalia de forma precisa a função celular. Essa limitação foi minimizada pela avaliação, de forma indireta, do metabolismo tecidual por meio da análise da gasometria arterial e dos níveis plasmáticos de ácido láctico.

6.7 Perspectivas

O modelo de CH utilizado no presente estudo, além da avaliação da perfusão tecidual com MEs, abre outras possibilidades de pesquisa ao permitir que outros parâmetros possam ser avaliados no CH.

Utilizando modelo semelhante de CH, demonstrou-se que os coágulos próximos à lesão da aorta de coelhos submetidos à HP possuíam trama de fibrina mais espessa que os submetidos à reanimação normotensiva, portanto, teoricamente mais resistentes (10).

A avaliação da perfusão tecidual poderia ser feita utilizando marcadores de isquemia. Níveis de metaloproteinases estão diretamente associados à intensidade da isquemia, da lesão de reperfusão e ao desfecho (135, 136). Com a vantagem de poderem ser dosadas em vários momentos, sem a necessidade de da retirada dos órgãos, permitiriam que a perfusão tecidual fosse avaliada em diferentes momentos do choque hemorrágico.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Com base nesta pesquisa, podemos concluir que:

1. Animais submetidos a CH não controlado por lesão da aorta apresentam a mesma perfusão tecidual se reanimados por reposição volêmica normotensiva ou em regime de hipotensão permissiva.

2. Animais submetidos a CH não controlado por lesão da aorta, sem reposição volêmica apresentam menor perda sanguínea, mas com redução significativa da perfusão tecidual.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Mock C, Arafat R, Chadbunchachai W, Joshipura M, Goosen J. What World Health Assembly Resolution 60.22 means to those who care for the injured. *World J Surg.* 2008;32(8):1636-42.
2. Poggetti RS. Acute care surgeon South American model. *World J Surg.* 2008;32(8):1626-9.
3. Parreira J, Soldá S, Rasslan S. Assessing the risk of death due to hemorrhage in victims of penetrating trauma to the torso admitted in shock: an objective method to select candidates for damage control *Rev Col Bras.* 2002;29(5):256-66.
4. Sapsford W. Should the 'C' in 'ABCDE' be altered to reflect the trend towards hypotensive resuscitation? *Scand J Surg.* 2008;97(1):4-11; discussion 2-3.
5. Mizushima Y, Tohira H, Mizobata Y, Matsuoka T, Yokota J. Fluid resuscitation of trauma patients: how fast is the optimal rate? *Am J Emerg Med.* 2005;23(7):833-7.
6. Battlefield Advanced Trauma Life Support. *Journal of the Royal Army Medical Corps.* 2001(147):187-94.
7. PHTLS (Prehospital Trauma Life Support) Committee of the National Association of Emergency Technicians in Cooperation with the American College of Surgeons. 6 ed. St. Louis Missouri: Mosby; 2007.
8. Bickell WH, Wall MJ, Jr., Pepe PE, Martin RR, Ginger VF, Allen MK, et al. Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries. *N Engl J Med.* 1994;331(17):1105-9.
9. American College of Surgeons. Committee on Trauma. ATLS, advanced trauma life support program for doctors. 7th ed. Chicago, IL: American College of Surgeons; 2004.
10. Rezende-Neto JB, Rizoli SB, Andrade MV, Ribeiro DD, Lisboa TA, Camargos ER, et al. Permissive hypotension and desmopressin enhance clot formation. *J Trauma.* 2010;68(1):42-50;.
11. Kreimeier U, Prueckner S, Peter K. Permissive hypotension. *Schweiz Med Wochenschr.* 2000;130(42):1516-24.

12. Bilkovski RN, Rivers EP, Horst HM. Targeted resuscitation strategies after injury. *Curr Opin Crit Care*. 2004;10(6):529-38.
13. Kowalenko T, Stern S, Dronen S, Wang X. Improved outcome with hypotensive resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock in a swine model. *J Trauma*. 1992;33(3):349-53; discussion 61-2.
14. Capone AC, Safar P, Stezoski W, Tisherman S, Peitzman AB. Improved outcome with fluid restriction in treatment of uncontrolled hemorrhagic shock. *J Am Coll Surg*. 1995;180(1):49-56.
15. Stern SA, Zink BJ, Mertz M, Wang X, Dronen SC. Effect of initially limited resuscitation in a combined model of fluid-percussion brain injury and severe uncontrolled hemorrhagic shock. *J Neurosurg*. 2000;93(2):305-14.
16. Stern SA. Low-volume fluid resuscitation for presumed hemorrhagic shock: helpful or harmful? *Curr Opin Crit Care*. 2001;7(6):422-30.
17. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
18. Krausz MM. Initial resuscitation of hemorrhagic shock. *World J Emerg Surg*. 2006;1:14.
19. Souba WW. *ACS surgery : principles & practice*, 2005. New York ; [Great Britain]: WebMD; 2005.
20. Barie PS, Hydo LJ. Epidemiology of multiple organ dysfunction syndrome in critical surgical illness. *Surg Infect (Larchmt)*. 2000 Fall;1(3):173-85; discussion 85-6.
21. Zenati MS, Billiar TR, Townsend RN, Peitzman AB, Harbrecht BG. A brief episode of hypotension increases mortality in critically ill trauma patients. *J Trauma*. 2002;53(2):232-6; discussion 6-7.
22. Wiggers CJ. *Physiology of shock*. New York: Commonwealth Fund; 1950.
23. Alam HB, Rhee P. New developments in fluid resuscitation. *Surg Clin North Am*. 2007;87(1):55-72, vi.
24. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest*. 2004;114(1):5-14.
25. Eiseman B. Pulmonary effects of nonthoracic trauma. Introduction to conference. *J Trauma*. 1968;8(5):649-50.
26. Shoemaker WC. A new approach to physiology, monitoring, and therapy of shock states. *World J Surg*. 1987;11(2):133-46.

27. Velmahos GC, Demetriades D, Shoemaker WC, Chan LS, Tatevossian R, Wo CC, et al. Endpoints of resuscitation of critically injured patients: normal or supranormal? A prospective randomized trial. *Ann Surg.* 2000;232(3):409-18.
28. Kortbeek JB, Al Turki SA, Ali J, Antoine JA, Bouillon B, Brasel K, et al. Advanced trauma life support, 8th edition, the evidence for change. *J Trauma.* 2008;64(6):1638-50.
29. Capone A, Safar P, Stezoski SW, Peitzman A, Tisherman S. Uncontrolled hemorrhagic shock outcome model in rats. *Resuscitation.* 1995;29(2):143-52.
30. Sondeen JL, Dubick MA, Holcomb JB, Wade CE. Uncontrolled hemorrhage differs from volume- or pressure-matched controlled hemorrhage in swine. *Shock.* 2007;28(4):426-33.
31. Gross D, Landau EH, Assalia A, Krausz MM. Is hypertonic saline resuscitation safe in 'uncontrolled' hemorrhagic shock? *J Trauma.* 1988;28(6):751-6.
32. Gross D, Landau EH, Klin B, Krausz MM. Quantitative measurement of bleeding following hypertonic saline therapy in 'uncontrolled' hemorrhagic shock. *J Trauma.* 1989;29(1):79-83.
33. Sindlinger JF, Soucy DM, Greene SP, Barber AE, Illner H, Shires GT. The effects of isotonic saline volume resuscitation in uncontrolled hemorrhage. *Surg Gynecol Obstet.* 1993;177(6):545-50.
34. Smail N, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Resuscitation after uncontrolled venous hemorrhage: Does increased resuscitation volume improve regional perfusion? *J Trauma.* 1998;44(4):701-8.
35. Bickell WH, Bruttig SP, Millnamow GA, O'Benar J, Wade CE. The detrimental effects of intravenous crystalloid after aortotomy in swine. *Surgery.* 1991;110(3):529-36.
36. Sakles JC, Sena MJ, Knight DA, Davis JM. Effect of immediate fluid resuscitation on the rate, volume, and duration of pulmonary vascular hemorrhage in a sheep model of penetrating thoracic trauma. *Ann Emerg Med.* 1997;29(3):392-9.
37. Owens TM, Watson WC, Prough DS, Uchida T, Kramer GC. Limiting initial resuscitation of uncontrolled hemorrhage reduces internal bleeding and subsequent volume requirements. *J Trauma.* 1995;39(2):200-7; discussion 8-9.
38. Solomonov E, Hirsh M, Yahiya A, Krausz MM. The effect of vigorous fluid resuscitation in uncontrolled hemorrhagic shock after massive splenic injury. *Crit Care Med.* 2000;28(3):749-54.

-
39. Krausz MM, Bashenko Y, Hirsh M. Crystalloid or colloid resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock after moderate splenic injury. *Shock*. 2000;13(3):230-5.
40. Matsuoka T, Hildreth J, Wisner DH. Uncontrolled hemorrhage from parenchymal injury: is resuscitation helpful? *J Trauma*. 1996;40(6):915-21; discussion 21-2.
41. Stern SA, Dronen SC, Birrer P, Wang X. Effect of blood pressure on hemorrhage volume and survival in a near-fatal hemorrhage model incorporating a vascular injury. *Ann Emerg Med*. 1993;22(2):155-63.
42. Leppaniemi A, Soltero R, Burris D, Pikoulis E, Waasdorp C, Ratigan J, et al. Fluid resuscitation in a model of uncontrolled hemorrhage: too much too early, or too little too late? *J Surg Res*. 1996;63(2):413-8.
43. Xiao N, Wang XC, Diao YF, Liu R, Tian KL. Effect of initial fluid resuscitation on subsequent treatment in uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *Shock*. 2004;21(3):276-80.
44. Burris D, Rhee P, Kaufmann C, Pikoulis E, Austin B, Erer A, et al. Controlled resuscitation for uncontrolled hemorrhagic shock. *J Trauma*. 1999;46(2):216-23.
45. Lu YQ, Cai XJ, Gu LH, Wang Q, Huang WD, Bao DG. Experimental study of controlled fluid resuscitation in the treatment of severe and uncontrolled hemorrhagic shock. *J Trauma*. 2007;63(4):798-804.
46. Doucet JJ, Hall RI. Limited resuscitation with hypertonic saline, hypertonic sodium acetate, and lactated Ringer's solutions in a model of uncontrolled hemorrhage from a vascular injury. *J Trauma*. 1999;47(5):956-63.
47. Hess JR, Brohi K, Dutton RP, Hauser CJ, Holcomb JB, Kluger Y, et al. The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. *J Trauma*. 2008;65(4):748-54.
48. Cotton BA, Guy JS, Morris JA, Jr., Abumrad NN. The cellular, metabolic, and systemic consequences of aggressive fluid resuscitation strategies. *Shock*. 2006;26(2):115-21.
49. Ledgerwood AM, Lucas CE. A review of studies on the effects of hemorrhagic shock and resuscitation on the coagulation profile. *J Trauma*. 2003;54(5 Suppl):S68-74.
50. Brummel-Ziedins K, Whelihan MF, Ziedins EG, Mann KG. The resuscitative fluid you choose may potentiate bleeding. *J Trauma*. 2006;61(6):1350-8.

-
51. Sondeen JL, Coppes VG, Holcomb JB. Blood pressure at which rebleeding occurs after resuscitation in swine with aortic injury. *J Trauma*. 2003;54(5 Suppl):S110-7.
52. Wangenstein SL, Eddy DM, Ludewig RM. The hydrodynamics of arterial hemorrhage. *Surgery*. 1968;64(5):912-21.
53. Bickell WH, Barrett SM, Romine-Jenkins M, Hull SS, Jr., Kinasewitz GT. Resuscitation of canine hemorrhagic hypotension with large-volume isotonic crystalloid: impact on lung water, venous admixture, and systemic arterial oxygen saturation. *Am J Emerg Med*. 1994;12(1):36-42.
54. Hughes CG, Weavind L, Banerjee A, Mercaldo ND, Schildcrout JS, Pandharipande PP. Intraoperative risk factors for acute respiratory distress syndrome in critically ill patients. *Anesth Analg*. 2010;111(2):464-7.
55. Crampin EJ, Smith NP, Langham AE, Clayton RH, Orchard CH. Acidosis in models of cardiac ventricular myocytes. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 2006;364(1842):1171-86.
56. Rezende-Neto JB, Moore EE, Masuno T, Moore PK, Johnson JL, Sheppard FR, et al. The abdominal compartment syndrome as a second insult during systemic neutrophil priming provokes multiple organ injury. *Shock*. 2003;20(4):303-8.
57. Rizoli S, Mamtani A, Scarpelini S, Kirkpatrick AW. Abdominal compartment syndrome in trauma resuscitation. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2009 Dec 4.
58. Cannon W, Frasier J, Cowell E. The preventive treatment of wound shock. *JAMA*. 1918;70:618-21.
59. Dutton RP, Mackenzie CF, Scalea TM. Hypotensive resuscitation during active hemorrhage: impact on in-hospital mortality. *J Trauma*. 2002;52(6):1141-6.
60. Craig RL, Poole GV. Resuscitation in uncontrolled hemorrhage. *Am Surg*. 1994;60(1):59-62.
61. Turner J, Nicholl J, Webber L, Cox H, Dixon S, Yates D. A randomised controlled trial of prehospital intravenous fluid replacement therapy in serious trauma. *Health Technol Assess*. 2000;4(31):1-57.
62. Garner J, Watts S, Parry C, Bird J, Cooper G, Kirkman E. Prolonged permissive hypotensive resuscitation is associated with poor outcome in primary blast injury with controlled hemorrhage. *Ann Surg*. 2010;251(6):1131-9.
63. Bowen I, ER. F, DR. R. Estimate of man's tolerance to the direct effects of air blast. In: Agency DAS, editor. Washington, D.C.: DASA - 2113; 1968.

-
64. Borgman MA, Spinella PC, Perkins JG, Grathwohl KW, Repine T, Beekley AC, et al. The ratio of blood products transfused affects mortality in patients receiving massive transfusions at a combat support hospital. *J Trauma*. 2007;63(4):805-13.
65. Rudolph AM, Heymann MA. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res*. 1967;21(2):163-84.
66. McDevitt DG, Nies AS. Simultaneous measurement of cardiac output and its distribution with microspheres in the rat. *Cardiovasc Res*. 1976;10(4):494-8.
67. Deveci D, Egginton S. Development of the fluorescent microsphere technique for quantifying regional blood flow in small mammals. *Exp Physiol*. 1999;84(4):615-30.
68. Prinzen FW, Bassingthwaight JB. Blood flow distributions by microsphere deposition methods. *Cardiovasc Res*. 2000;45(1):13-21.
69. Glenny RW, Bernard S, Brinkley M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol*. 1993;74(5):2585-97.
70. Gervais M, Demolis P, Domergue V, Lesage M, Richer C, Giudicelli JF. Systemic and regional hemodynamics assessment in rats with fluorescent microspheres. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;33(3):425-32.
71. Van Oosterhout MF, Prinzen FW, Sakurada S, Glenny RW, Hales JR. Fluorescent microspheres are superior to radioactive microspheres in chronic blood flow measurements. *Am J Physiol*. 1998;275(1 Pt 2):H1110-5.
72. Hodeige D, de Pauw M, Eechaute W, Weyne J, Heyndrickx GR. On the validity of blood flow measurement using colored microspheres. *Am J Physiol*. 1999;276(4 Pt 2):H1150-8.
73. Prinzen FW, Glenny RW. Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement. *Cardiovasc Res*. 1994;28(10):1467-75.
74. Hoffman WE, Miletich DJ, Albrecht RF. Repeated microsphere injections in rats. *Life Sci*. 1981;28(19):2167-72.
75. Kobayashi N, Kobayashi K, Kouno K, Horinaka S, Yagi S. Effects of intra-atrial injection of colored microspheres on systemic hemodynamics and regional blood flow in rats. *Am J Physiol*. 1994;266(5 Pt 2):H1910-7.
76. Glenny RW, Bernard SL, Lamm WJ. Hemodynamic effects of 15-microm-diameter microspheres on the rat pulmonary circulation. *J Appl Physiol*. 2000;89(2):499-504.

-
77. Stanek KA, Smith TL, Murphy WR, Coleman TG. Hemodynamic disturbances in the rat as a function of the number of microspheres injected. *Am J Physiol.* 1983;245(6):H920-3.
78. Van de Castele M, Sagesser H, Zimmermann H, Reichen J. Characterisation of portal hypertension models by microspheres in anaesthetised rats: a comparison of liver flow. *Pharmacol Ther.* 2001;90(1):35-43.
79. Kleen M, Zwissler B, Schosser R, Messmer K. Determination of regional pulmonary blood flow with systemically injected nonentrapped microspheres. *J Appl Physiol.* 1996;81(2):695-706.
80. Levine BA, Sirinek KR, Gaskill HV, 3rd. The radiolabeled microsphere technique in gut blood flow measurement--current practice. *J Surg Res.* 1984;37(3):241-55.
81. Duerr RL, McKirnan MD, Gim RD, Clark RG, Chien KR, Ross J, Jr. Cardiovascular effects of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in chronic left ventricular failure in the rat. *Circulation.* 1996;93(12):2188-96.
82. Albornoz L, de las Heras M, Bildoza M, Bandi JC, Mastai RC. Chronic administration of propylthiouracil ameliorates hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats. *Gastroenterol Hepatol.* 2005;28(9):537-40.
83. Migita R, Gonzales A, Gonzales ML, Vandegriff KD, Winslow RM. Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J Appl Physiol.* 1997;82(6):1995-2002.
84. Kuwahira I, Gonzalez NC, Heisler N, Piiper J. Regional blood flow in conscious resting rats determined by microsphere distribution. *J Appl Physiol.* 1993;74(1):203-10.
85. Wicker PA, Healy BP. Variability of coronary blood flow measurements with microspheres in the rat: role of injection site and sphere number. *Cardiovasc Res.* 1989;23(5):443-52.
86. Bruscin V, de Figueiredo LF, Rasslan S, Varicoda EY, Rocha e Silva M. Fluid resuscitation improves hemodynamics without increased bleeding in a model of uncontrolled hemorrhage induced by an iliac artery tear in dogs. *J Trauma.* 2002;52(6):1147-52.
87. Soucy DM, Sindlinger JF, Greene SP, Barber AE, Illner HP, Shires GT. Isotonic saline resuscitation in uncontrolled hemorrhage under various anesthetic conditions. *Ann Surg.* 1995;222(1):87-93.
88. Torres LN, Torres Filho IP, Barbee RW, Tiba MH, Ward KR, Pittman RN. Systemic responses to prolonged hemorrhagic hypotension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(5):H1811-20.

-
89. Hirshberg A, Hoyt DB, Mattox KL. Timing of fluid resuscitation shapes the hemodynamic response to uncontrolled hemorrhage: analysis using dynamic modeling. *J Trauma*. 2006;60(6):1221-7.
90. Sizenando PMS, Pinto LR. Análise do Serviço de Atendimento Móvel de Urgência (SAMU) de Belo Horizonte via simulação e otimização. 42º Simpósio Brasileiro de Pesquisa Operacional; 2009 08-31-2010; Bento Gonçalves - RS, Brasil. Universidade Federal Santa Maria; 2009.
91. Nakai M, Tamaki K, Yamamoto J, Shimouchi A, Maeda M. A minimally invasive technique for multiple measurement of regional blood flow of the rat brain using radiolabeled microspheres. *Brain Res*. 1990 ;507(1):168-71.
92. Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ, Lumb WV, Jones EW. *Lumb & Jones' veterinary anesthesia*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996.
93. Rezende-Neto JB, Rizoli SB, Andrade MV, Ribeiro DD, Lisboa TA, Camargos ER, et al. Permissive hypotension and desmopressin enhance clot formation. *J Trauma*. 2010;68(1):42-50; discussion -1.
94. Riddez L, Johnson L, Hahn RG. Central and regional hemodynamics during crystalloid fluid therapy after uncontrolled intra-abdominal bleeding. *J Trauma*. 1998;44(3):433-9.
95. Watenpaugh DE, Gaffney FA. Measurement of net whole-body transcapillary fluid transport and effective vascular compliance in humans. *J Trauma*. 1998;45(6):1062-8.
96. Paes-da-Silva F, Gonzalez AP, Tibirica E. Effects of fluid resuscitation on mesenteric microvascular blood flow and lymphatic activity after severe hemorrhagic shock in rats. *Shock*. 2003;19(1):55-60.
97. Heckbert SR, Vedder NB, Hoffman W, Winn RK, Hudson LD, Jurkovich GJ, et al. Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients. *J Trauma*. 1998;45(3):545-9.
98. Haizlip TM, Jr., Poole GV, Falzon AL. Initial resuscitation volume in uncontrolled hemorrhage: effects on organ function. *Am Surg*. 1999;65(3):215-7.
99. Varela JE, Cohn SM, Diaz I, Giannotti GD, Proctor KG. Splanchnic perfusion during delayed, hypotensive, or aggressive fluid resuscitation from uncontrolled hemorrhage. *Shock*. 2003;20(5):476-80.
100. Martin M, Murray J, Berne T, Demetriades D, Belzberg H. Diagnosis of acid-base derangements and mortality prediction in the trauma intensive care unit: the physiochemical approach. *J Trauma*. 2005;58(2):238-43.
101. Rutherford EJ, Morris JA, Jr., Reed GW, Hall KS. Base deficit stratifies mortality and determines therapy. *J Trauma*. 1992 Sep;33(3):417-23.

-
102. Krishna G, Sleight JW, Rahman H. Physiological predictors of death in exsanguinating trauma patients undergoing conventional trauma surgery. *Aust N Z J Surg.* 1998;68(12):826-9.
103. Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Norris JM, Lezotte DC, Hamman RF. Multiple organ failure can be predicted as early as 12 hours after injury. *J Trauma.* 1998;45(2):291-301; discussion -3.
104. Rixen D, Raum M, Bouillon B, Schlosser LE, Neugebauer E. [Predicting the outcome in severe injuries: an analysis of 2069 patients from the trauma register of the German Society of Traumatology (DGU)]. *Unfallchirurg.* 2001;104(3):230-9.
105. Zehtabchi S, Baron BJ. Utility of base deficit for identifying major injury in elder trauma patients. *Acad Emerg Med.* 2007;14(9):829-31.
106. Paladino L, Sinert R, Wallace D, Anderson T, Yadav K, Zehtabchi S. The utility of base deficit and arterial lactate in differentiating major from minor injury in trauma patients with normal vital signs. *Resuscitation.* 2008;77(3):363-8.
107. Davis JW, Shackford SR, Mackersie RC, Hoyt DB. Base deficit as a guide to volume resuscitation. *J Trauma.* 1988;28(10):1464-7.
108. Dunne JR, Tracy JK, Scalea TM, Napolitano LM. Lactate and base deficit in trauma: does alcohol or drug use impair their predictive accuracy? *J Trauma.* 2005;58(5):959-66.
109. Blow O, Magliore L, Claridge JA, Butler K, Young JS. The golden hour and the silver day: detection and correction of occult hypoperfusion within 24 hours improves outcome from major trauma. *J Trauma.* 1999;47(5):964-9.
110. Ivatury RR, Simon RJ, Havriliak D, Garcia C, Greenbarg J, Stahl WM. Gastric mucosal pH and oxygen delivery and oxygen consumption indices in the assessment of adequacy of resuscitation after trauma: a prospective, randomized study. *J Trauma.* 1995;39(1):128-34; discussion 34-6.
111. Manikis P, Jankowski S, Zhang H, Kahn RJ, Vincent JL. Correlation of serial blood lactate levels to organ failure and mortality after trauma. *Am J Emerg Med.* 1995;13(6):619-22.
112. Sloan EP, Koenigsberg MD, Philbin NB, Gao W. Diaspirin cross-linked hemoglobin infusion did not influence base deficit and lactic acid levels in two clinical trials of traumatic hemorrhagic shock patient resuscitation. *J Trauma.* 2010;68(5):1158-71.
113. Miller ED, Jr., Kistner JR, Epstein RM. Whole-body distribution of radioactively labelled microspheres in the rat during anesthesia with halothane, enflurane, or ketamine. *Anesthesiology.* 1980;52(4):296-302.

-
114. Schrock GD, Krahmer RL, Ferguson JL. Coronary flow by left atrial and left ventricular microsphere injection in the rat. *Am J Physiol.* 1990;259(2 Pt 2):H635-8.
115. Hafstrom L, Persson B, Sundqvist K. Measurements of cardiac output and organ blood flow in rats using ⁹⁹Tcm labelled microspheres. *Acta Physiol Scand.* 1979;106(2):123-8.
116. Kobrin I, Kardon MB, Oigman W, Pegram BL, Frohlich ED. Role of site of microsphere injection and catheter position on systemic and regional hemodynamics in rat. *Am J Physiol.* 1984;247(1 Pt 2):H35-9.
117. Kuwahira I, Mori H, Moue Y, Shinozaki Y, Ohta Y, Yamabayashi H, et al. Cardiac output and regional blood flow measurement with nonradioactive microspheres by X-ray fluorescence spectrometry in rats. *Adv Exp Med Biol.* 1994;345:877-84.
118. Seyde WC, Longnecker DE. Anesthetic influences on regional hemodynamics in normal and hemorrhaged rats. *Anesthesiology.* 1984;61(6):686-98.
119. Seyde WC, McGowan L, Lund N, Duling B, Longnecker DE. Effects of anesthetics on regional hemodynamics in normovolemic and hemorrhaged rats. *Am J Physiol.* 1985;249(1 Pt 2):H164-73.
120. Tuma RF, Vasthare US, Irion GL, Wiedeman MP. Considerations in use of microspheres for flow measurements in anesthetized rat. *Am J Physiol.* 1986;250(1 Pt 2):H137-43.
121. Idvall J, Aronsen KF, Stenberg P. Tissue perfusion and distribution of cardiac output during ketamine anesthesia in normovolemic rats. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1980;24(3):257-63.
122. Tsuchiya M, Walsh GM, Frohlich ED. Systemic hemodynamic effects of microspheres in conscious rats. *Am J Physiol.* 1977;233(5):H617-21.
123. De Angelis K, Gama VM, Farah VA, Irigoyen MC. Blood flow measurements in rats using four color microspheres during blockade of different vasopressor systems. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(1):119-25.
124. Sharma AC, Singh G, Gulati A. Decompensation characterized by decreased perfusion of the heart and brain during hemorrhagic shock: role of endothelin-1. *J Trauma.* 2002;53(3):531-6.
125. Chen RY, Fan FC, Schuessler GB, Simchon S, Kim S, Chien S. Regional cerebral blood flow and oxygen consumption of the canine brain during hemorrhagic hypotension. *Stroke.* 1984;15(2):343-50.
126. Heistad DD, Marcus ML, Mueller S. Measurement of cerebral blood flow with microspheres. *Arch Neurol.* 1977;34(11):657-9.

-
127. Schulte BP, Leyten AC, Herman B. Pre-stroke and immediate post-stroke hypertension: neuroepidemiological data. *Br J Clin Pract Suppl.* 1985;39:31-3.
128. Chiara O, Pelosi P, Segala M, Turconi MG, Brazzi L, Bottino N, et al. Mesenteric and renal oxygen transport during hemorrhage and reperfusion: evaluation of optimal goals for resuscitation. *J Trauma.* 2001;51(2):356-62.
129. Legrand M, Mik EG, Balestra GM, Lutter R, Pirracchio R, Payen D, et al. Fluid resuscitation does not improve renal oxygenation during hemorrhagic shock in rats. *Anesthesiology.* 2010;112(1):119-27.
130. Nascimento P, Jr., de Paiva Filho O, de Carvalho LR, Braz JR. Early hemodynamic and renal effects of hemorrhagic shock resuscitation with lactated Ringer's solution, hydroxyethyl starch, and hypertonic saline with or without 6% dextran-70. *J Surg Res.* 2006;136(1):98-105.
131. Ceppa EP, Fuh KC, Bulkley GB. Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. *Curr Opin Crit Care.* 2003;9(2):127-32.
132. Matheson PJ, Wilson MA, Garrison RN. Regulation of intestinal blood flow. *J Surg Res.* 2000;93(1):182-96.
133. Shah KJ, Chiu WC, Scalea TM, Carlson DE. Detrimental effects of rapid fluid resuscitation on hepatocellular function and survival after hemorrhagic shock. *Shock.* 2002;18(3):242-7.
134. Smail N, Catania RA, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Gut and liver: the organs responsible for increased nitric oxide production after trauma-hemorrhage and resuscitation. *Arch Surg.* 1998;133(4):399-405.
135. Spinale FG, Koval CN, Deschamps AM, Stroud RE, Ikonomidis JS. Dynamic changes in matrix metalloproteinase activity within the human myocardial interstitium during myocardial arrest and reperfusion. *Circulation.* 2008;118(14 Suppl):S16-23.
136. Tanindi A, Sahinarslan A, Elbeg S, Cemri M. Association of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and interleukin-6 with epicardial and myocardial perfusion. *Coron Artery Dis.* 2011;22(4):253-8.