

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA**

**ROGER LAGE ALVES**

**EFEITO DO ESTÍMULO VAGAL SOBRE A COAGULAÇÃO NO  
MODELO DE CHOQUE HEMORRÁGICO CONTROLADO EM RATOS**

**BELO HORIZONTE**

**2014**

Roger Lage Alves

EFEITO DO ESTÍMULO VAGAL SOBRE A COAGULAÇÃO NO MODELO DE CHOQUE  
HEMORRÁGICO CONTROLADO EM RATOS

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em cirurgia e oftalmologia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em cirurgia.

Área de concentração: Cirurgia e Oftalmologia

Orientador: Professor José Renan da Cunha  
Melo

Co-orientador: Professor João Baptista  
Rezende-Neto

Belo Horizonte  
Faculdade de Medicina da UFMG  
2014

*Este trabalho foi motivado por um projeto piloto que já se fez definitivo: minha família; por isso eu o dedico à Juliana, ao Davi, ao Miguel e ao Tomás, por me incentivarem a melhorar em tudo aquilo que faço.*

## Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos aos professores João Baptista Rezende-Neto e José Renan da Cunha Melo, exemplos de busca pelo conhecimento e exercício da medicina desde os tempos da faculdade.

Ao professor Marcus Vinicius Melo de Andrade pelo fundamental apoio no estudo das citocinas.

À professora Cinthia Gabriele Michel Cardoso Trant, pela inestimável ajuda na dosagem das citocinas.

Aos acadêmicos Mário Gissoni de Carvalho e Thiago Fabrício Pereira de Almeida pela companhia e ajuda nos experimentos.

À técnica Vanuza Chagas pelo cuidado no melhor funcionamento do Laboratório Prof. Lineu Freire; assim como a todos os funcionários do Biotério e do Departamento de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da UFMG.

Finalmente, a todos familiares e amigos que compartilharam as angústias e alegrias desta longa empreitada.

## RESUMO

*Introdução\_* A influência do estímulo vagal sobre a coagulação foi demonstrada, neste trabalho, pela tromboelastometria no modelo experimental de choque hemorrágico controlado em ratos. A coagulopatia associada ao trauma. O distúrbio de coagulação relacionado ao trauma resulta de processo multifatorial, envolvendo, sobretudo, choque hemorrágico e inflamação. Os níveis elevados de IL-1, IL-6 e TNF  $\alpha$  estão relacionados à resposta inflamatória exacerbada e ao distúrbio de coagulação. Na última década, foi demonstrada a ação anti-inflamatória da via colinérgica vagal, através da interação da acetilcolina em receptores nicotínicos dos macrófagos, modulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Modelos experimentais demonstraram a efetividade da estimulação vagal sobre a resposta inflamatória.

*Metodologia\_* Ratos Wistar machos foram submetidos à cervicotomia, choque hemorrágico controlado, vagotomia e estimulação vagal. Foram coletadas amostras sanguíneas iniciais e finais para tromboelastometria e dosagem de citocinas pelo método ELISA; a análise estatística foi pelo ANOVA e pelo *t student*.

*Resultados\_* Nos animais com vago íntegro e submetidos ao choque hemorrágico, a força tênsil do coágulo foi reduzida; naqueles animais – cujo nervo vago foi seccionado – submetidos ao choque e à estimulação distal, a força tênsil aumentou e o tempo para formação do coágulo diminuiu. Além disso, houve redução significativa na produção de IL-1; a vagotomia bilateral e a estimulação com o vago íntegro, previamente ao choque não produziu diferença significativa nos parâmetros de tromboelastometria.

*Conclusão\_* A estimulação vagal distal melhora a coagulação após o choque hemorrágico e reduz a produção de IL-1; vagotomia, estimulação prévia ao choque e nervo vago íntegro, não produziram diferença sobre a coagulação. Finalmente, o choque hemorrágico, sem estímulo vagal reduz a força tênsil do coágulo.

## ABSTRACT

*Background\_* In the present work the influence of vagal stimulation on the coagulation profile as demonstrated by tromboelastometria in a controlled hemorrhagic shock model was investigated. The trauma coagulopathy is associated to hemorrhagic shock and inflammation with increase of plasmatic IL-1, IL-6 and TNF  $\alpha$  levels. Cholinergic anti-inflammatory pathways were demonstrated to regulate inflammatory cytokines release. Vagal stimulation was proved to modify the inflammatory response pattern. The purpose of this paper was to investigate the role played by vagal stimulation on the hemorrhagic shock-induced coagulopathy.

*Methods \_* Baseline and final measurements of thromboelastometry and cytokines were analyzed in rats submitted to hemorrhagic shock preceded or followed by cervical vagal stimulation ; data expressed as mean +/- SD were analyzed by ANOVA and Student t test.

*Results \_* Hemorrhagic shock without vagal stimulation, worsens maximum clot firmness (MCF) and reduced IL-1 levels. Stimulation of the caudal end of the vagus nerve improved maximum clot firmness (MCF), clot formation time (CFT) and anticipated thrombin organization ( $\alpha$  angle). Either bilateral vagotomy or bilateral stimulation of intact vagus before acute hemorrhagic shock did not modified the coagulation profile.

*Conclusions\_* Caudal stimulation of the distal edge of a seccioned vagus improves coagulation and reduces IL-1 plasmatic levels after acute hypovolemic shock, Bilateral vagotomy or stimulation of intact vagus before hemorrhagic shock do not modify coagulation. Acute hypovolemic controlled hemorrhagic shock without vagal stimulation worsens maximum clot firmness.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Centímetros.....	cm
Comissão de ética no uso de animais .....	CEUA
Fator de necrose tumoral .....	TNF- $\alpha$
Fator nuclear $\kappa$ B .....	NF- $\kappa$ B
Figura.....	fig
Gramas.....	g
Graus centígrados .....	$^{\circ}$ C
Interleucina-1 .....	IL-1
Interleucina-6.....	IL-6
Interleucina-10.....	IL-10
Máxima formação do coágulo .....	MCF
Microlitros .....	$\mu$ l
Miligramas.....	mg
Mililitros .....	ml
Milímetros de mercúrio .....	mmHg
Minutos.....	min
Pressão arterial média.....	PAM
Quilogramas .....	kg
Rotações por minuto.....	RPM
Tempo de coagulação .....	CT
Tempo de formação do coágulo .....	CFT
Valor de p .....	p
Volume sanguíneo .....	VS

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 _ Cronograma das intervenções no grupo 1 .....	17
Figura 2 _ Cronograma das intervenções no grupo 2 .....	18
Figura 3 _ Cronograma das intervenções no grupo 3A .....	19
Figura 4 _ Cronograma das intervenções no grupo 3B .....	20
Figura 5 _ Cronograma das intervenções no grupo 4A .....	21
Figura 6 _ Cronograma das intervenções no grupo 4B .....	22
Figura 7 _ Variação na resposta hemodinâmica entre os grupos 1, 2 e 4A.....	
Figura 8 _ Variação entre os valores basais e finais para CT no grupo1 .....	25
Figura 9 _ Variação entre os valores basais e finais para CFT no grupo1 .....	25
Figura 10 _ Variação entre os valores basais e finais para MCF no grupo1 .....	26
Figura 11 _ Variação entre os valores basais e finais para ALFA no grupo1 .....	26
Figura 12 _ Curva de tromboelastometria do rato 4, grupo 1: Amostra basal .....	27
Figura 13 _ Curva de tromboelastometria do rato 4, grupo 1: Amostra final .....	28
Figura 14 _ Comparativo entre a tromboelastometria basal e final do rato 4, grupo 1 .....	29
Figura 15 _ Variação entre os valores basais e finais para MCF no grupo 2 .....	30
Figura 16 _ Variação entre os valores basais e finais para CT no grupo 2.....	31
Figura 17 _ Variação entre os valores basais e finais para CFT no grupo 2 .....	31
Figura 18 _ Variação entre os valores basais e finais para ALFA no grupo 2 .....	32
Figura 19 _ Curva de tromboelastometria do rato 5, grupo 2: Amostra basal .....	33
Figura 20 _ Curva de tromboelastometria do rato 5, grupo 2: Amostra final .....	33
Figura 21 _ Comparativo entre a tromboelastometria basal e final do rato 5, grupo 2 .....	34
Figura 22 _ Variação entre os valores basais e finais para CT no grupo 3A.....	35
Figura 23 _ Variação entre os valores basais e finais para CFT no grupo 3A.....	36
Figura 24 _ Variação entre os valores basais e finais para MCF no grupo 3A .....	36



Figura 25 _ Variação entre os valores basais e finais para ALFA no grupo 3A .....	37
Figura 26 _ Variação entre os valores basais e finais para CT no grupo 3B .....	38
Figura 27 _ Variação entre os valores basais e finais para CFT no grupo 3B.....	38
Figura 28 _ Variação entre os valores basais e finais para MCF no grupo 3B.....	39
Figura 29 _ Variação entre os valores basais e finais para ALFA no grupo 3B.....	39
Figura 30 _ Variação entre os valores basais e finais para MCF no grupo 4A .....	40
Figura 31 _ Variação entre os valores basais e finais para CFT no grupo 4A.....	41
Figura 32 _ Variação entre os valores basais e finais para ALFA no grupo 4A .....	41
Figura 33 _ Curva de tromboelastometria do rato 5, grupo 4A: Amostra basal .....	42
Figura 34 _ Curva de tromboelastometria do rato 5, grupo 4A: Amostra final .....	42
Figura 35 _ Comparativo entre a tromboelastometria basal e final do rato 5, grupo 4A .....	43
Figura 36 _ Variação entre os valores basais e finais para CT no grupo 4B .....	44
Figura 37 _ Variação entre os valores basais e finais para CFT no grupo 4B.....	45
Figura 38 _ Variação entre os valores basais e finais para MCF no grupo 4B.....	45
Figura 39 _ Variação entre os valores basais e finais para ALFA no grupo 4B.....	46
Figura 40 _ Variação entre os valores basais e finais para IL-1 no grupo 1.....	47
Figura 41 _ Variação entre os valores basais e finais para IL-1 no grupo 2.....	48
Figura 42 _ Variação entre os valores basais e finais para IL-1 no grupo 4A.....	48
Figura 43 _ Variação entre os valores basais e finais para IL-1 no grupo 4B .....	49
Figura 44 _ Variação entre os valores basais e finais para IL-6 no grupo 4A.....	49
Figura 45 _ Variação entre os valores basais e finais para IL-10 no grupo 4A.....	50

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 <b>OBJETIVOS</b> .....	15
<b>2. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	16
2.1 ANIMAIS .....	16
2.1.1 <b>Procedimentos cirúrgicos</b> .....	17
2.1.2 <b>Amostras basais</b> .....	17
2.1.3 <b>Intervenções</b> .....	17
<b>3. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	5426
<b>4. RESULTADOS</b> .....	27
4.1 EFEITO DA INTERVENÇÃO CIRÚRGICA NA COAGULAÇÃO – GRUPO 1 .....	28
4.2 EFEITO DO CHOQUE HEMORRÁGICO, SEM ESTÍMULO VAGAL, NA COAGULAÇÃO – GRUPO 2A .....	33
4.3 EFEITO DO ESTÍMULO VAGAL ANTERIOR AO CHOQUE HEMORRÁGICO – GRUPO 3A .....	38
4.4 EFEITO DA SECÇÃO VAGAL BILATERAL ANTERIOR AO CHOQUE HEMORRÁGICO –GRUPO 3B .....	40
4.5 EFEITO DO ESTÍMULO VAGAL EFERENTE APÓS CHOQUE HEMORRÁGICO– GRUPO 4A .....	43
4.6 EFEITO DO ESTÍMULO VAGAL AFERENTE APÓS CHOQUE HEMORRÁGICO– GRUPO 4B .....	48
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	55
5.1 PREPARAÇÃO CIRÚRGICA E COAGULAÇÃO .....	56
5.2 CHOQUE HEMORRÁGICO E COAGULAÇÃO .....	56
5.3 VAGO SECCIONADO: ESTÍMULO VAGAL DISTAL E COAGULAÇÃO .....	57
5.4 VAGO SECCIONADO: ESTÍMULO VAGAL PROXIMAL E COAGULAÇÃO .....	58
5.5 VAGO ÍNTEGRO: ESTÍMULO BILATERAL, PRÉVIO AO CHOQUE HEMORRÁGICO .....	59
5.6 VAGO SECCIONADO: SECÇÃO BILATERAL DO NERVO VAGO, PRÉVIA AO CHOQUE HEMORRÁGICO .....	59
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	60
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	61
<b>8. ANEXOS</b> .....	65
8.1 PROTOCOLO DE APROVAÇÃO NO CEUA .....	65

8.2 CARTA PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGO.....	66
8.3 FOTOS DO EXPERIMENTO .....	67

## 1. INTRODUÇÃO

O Trauma é considerado problema de saúde pública em todo o mundo. Choque hemorrágico pós-trauma é a segunda causa de morte em pacientes politraumatizados, causando repercussão sistêmica e desequilíbrio na homeostase, em decorrência da resposta inflamatória desencadeada<sup>1,2</sup>. Ocorre distúrbio de coagulação em 25% dos pacientes admitidos na sala de trauma, aumentando em quatro vezes a mortalidade dos pacientes com essa alteração<sup>2</sup>.

A hemorragia grave (classificada como perda de 100% do volume sanguíneo em 24 horas ou 50% em três horas; ou, ainda, 150 ml/h ou 1,5 ml/min/kg <sup>colocar ref</sup>) está necessariamente ligada a alterações graves na coagulação. Para o controle do sangramento são necessárias quantidades suficientes de trombina e outros substratos que constituem a formação normal do coágulo, dependendo da ativação do fator XIII e do fator ativador de trombina, inibindo a fibrinólise.

Tradicionalmente, a terapia de reposição dos fatores de coagulação é baseada nos testes de coagulação de rotina, que refletem apenas um pequeno montante de trombina formada no início do processo de coagulação. Métodos de análise viscoelástica da coagulação (tromboelastografia e tromboelastometria) foram recentemente desenvolvidos com o propósito de diferenciar os diversos tipos de deficiência dos fatores de coagulação como fibrinogênio, plaquetas ou fator XIII, além da presença de hiperfibrinólise.

A Coagulopatia relacionada aos traumatismos resulta de processo multi-fatorial, envolvendo trauma tecidual, hemodiluição, choque, hipotermia e inflamação<sup>3,4</sup>. A grande quantidade de cristaloides utilizada na reposição volêmica do atendimento inicial ao trauma provoca acidemia adicional, edema intersticial e disfunção na microcirculação. A hipotermia, fenômeno diretamente associado ao choque hemorrágico, resulta em atraso na formação de trombina, queda na síntese de fibrinogênio e redução na contagem de plaquetas. O resultado da acidose está relacionado à hipoperfusão e se reflete na geração deficiente de trombina, redução do fibrinogênio e queda das plaquetas. Foi demonstrada relação direta entre coagulopatia do trauma e insuficiência de múltiplos órgãos, sendo causada, em parte, pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ )<sup>2,5,6</sup>.

TNF- $\alpha$  e IL-1 exercem função moduladora sobre a proteína C e alteram a via extrínseca da cascata de coagulação. Após trauma grave, os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 estão elevados, havendo provável relação entre gravidade do trauma e liberação dessas citocinas, aumentando a mortalidade<sup>5</sup>. A resposta inflamatória sistêmica está naturalmente relacionada ao distúrbio da coagulação. Em pacientes com sepse grave há relação direta entre ativação da coagulação com o início da resposta inflamatória, resultando em trombose microvascular, contribuindo com a falência de múltiplos órgãos<sup>6</sup>. Há uma divergência entre a tendência a fenômenos trombóticos e ao sangramento como resultado da resposta inflamatória ao choque hemorrágico, sendo observada uma diferença entre os modelos de sepse e sangramento pós trauma<sup>14,15</sup>. O grau de hipoperfusão tecidual pode produzir alargamento dos tempos de coagulação, havendo ativação precoce dos fatores de coagulação, incluindo a trombina cuja depuração está reduzida, o que resulta em maior formação de complexo trombina-trombomodulina nas células endoteliais e consequente ativação da proteína C (anticoagulante). Por este mecanismo, a geração de trombina é reduzida por inibição dos fatores V e VIII, sendo induzido o processo de fibrinólise. De maneira oposta à sepse, no trauma hemorrágico não se observa trombose na microvasculatura enquanto se observa disfunção plaquetária e do fibrinogênio.

Citocinas são moléculas de baixo peso ligadas a receptores específicos, causando diferenciação de células imunes, proliferação e ativação. Sua liberação é desencadeada pela cascata inflamatória<sup>7</sup>. As células que liberam as citocinas (principalmente IL-1 $\beta$  e IL-6) são principalmente os macrófagos e monócitos. A resposta inflamatória deve ser precisamente regulada, o excesso ou a insuficiência leva a desequilíbrio irreversível. Por outro lado, as células ativadas do sistema imune liberam citocinas anti-inflamatórias, principalmente IL-10. No trauma, o sistema imune e a subsequente resposta inflamatória são ativadas por células de necrose e lesão tecidual<sup>7</sup>. Não há armazenamento de citocinas, ocorre síntese e liberação a cada ativação da cascata inflamatória. A deflagração da resposta inflamatória provoca um pico de liberação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1, com tempo de meia vida curto e ocorrência destas moléculas próximo ao local de liberação. O tônus vascular é especialmente sensível à ação das interleucinas, exacerbando-se vasodilatação, intermediada pelo óxido nítrico.

O nervo vago origina-se no bulbo e é considerado o principal par craniano do sistema nervoso parassimpático, interligando o sistema nervoso central à inervação esplâncnica, principalmente

baço e fígado, locais importantes de produção e ação das citocinas<sup>8,9</sup>. Há componentes sensoriais ( aferentes) e motores ( eferentes) na função vagal funcionando em um sistema onde a liberação de citocinas pró-inflamatórias estimula o cérebro a enviar estímulos periféricos, que inibem a formação de novas moléculas inflamatórias<sup>8</sup>.

A estimulação periférica do nervo vago, em ratos, diminui os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ , possivelmente por ação da acetilcolina liberada nas terminações nervosas pós-ganglionares. Além disso, em culturas de células humanas, observou-se redução na produção de TNF- $\alpha$ , provocada pela ação da acetilcolina em receptores nicotínicos de macrófagos<sup>9,10</sup>. Antagonistas de receptores nicotínicos aboliram o efeito da acetilcolina na liberação de citocinas pró-inflamatórias em culturas de macrófagos<sup>9</sup>. A estimulação vagal pós-traumatismo crânio encefálico levou ao aumento da grelina, um hormônio orexígeno predominantemente produzido no estômago e intestino, com propriedades anti-inflamatórias, cujo receptor se localiza no núcleo motor dorsal do vago; a grelina se liga a receptores nos macrófagos, inibindo a fosforilação do NF $\kappa$ B, o que reduz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias<sup>12</sup>. Em modelo experimental de queimadura, foi demonstrado que a estimulação vagal anterior e posterior ao trauma melhorou a integridade da barreira intestinal após aumento de produção da ocludina, proteína atuante na junção celular, garantindo menor permeabilidade e menor propensão à translocação bacteriana<sup>13</sup>.

## 1.1 OBJETIVOS

Avaliar alterações da coagulação sanguínea relacionadas à estimulação vagal, vagotomia e choque hemorrágico controlado em ratos, por meio da tromboelastometria e da dosagem de citocina

## 2.MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos pesando entre 250g e 350g alojados em gaiolas de 35 x 45 x 15cm (quatro animais por gaiola), submetidos a ciclos dia/noite de 12 horas, no biotério da Faculdade de Medicina, à temperatura de 25°C. Os animais foram alimentados com ração para ratos (Purina®, Cotia, SP, Brasil) e água *ad libitum* até o momento do experimento. O conjunto foi dividido em seis grupos, cada um contendo seis animais, submetidos aos procedimentos descritos a seguir:

#### *Nervo vago íntegro*

- **Grupo 1 (cirúrgico experimental):** cervicotomia sem choque hemorrágico e sem estímulo vagal.
- **Grupo 2:** cervicotomia com choque hemorrágico e sem estímulo vagal.
- **Grupo 3A:** cervicotomia com estímulo vagal bilateral anterior ao choque hemorrágico.

#### *Nervo vago seccionado*

- **Grupo 3B:** cervicotomia com vagotomia bilateral anterior ao choque hemorrágico.
- **Grupo 4A:** cervicotomia, choque hemorrágico, vagotomia bilateral e estímulo vagal bilateral distal.
- **Grupo 4B:** cervicotomia, choque hemorrágico, vagotomia bilateral e estímulo vagal bilateral proximal.



### **2.1.1 Procedimentos cirúrgicos**

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 intra-peritoneal. Em seguida foram submetidos à canulação da veia jugular direita, para infusão de fluidos e drogas, e da artéria carótida direita para monitorização da pressão arterial média (PAM). Ambas com cateter do tipo Jelco® calibre 21 (Johnson & Johnson, Rodovia Presidente Dutra 154, São José dos Campos, SP). O nervo vago foi identificado e cuidadosamente separado da artéria carótida para posterior estimulação; a secção vagal ocorreu entre reparos com fio de seda 3-0 (Polysuture®, São Sebastião do Paraíso-MG), individualizando-se os segmentos do nervo.

### **2.1.2 Amostras iniciais**

Todas as amostras foram obtidas pelo cateter posicionado na artéria carótida. Coletou-se 1ml de sangue, em frasco contendo citrato de sódio a 3,2%, para a realização da tromboelastometria basal (Rotem® Coagulation analyzer Pentapharm, Munich, Alemanha). Outra amostra de sangue de 1ml foi obtida e colocada em frasco contendo solução de EDTA para a dosagem das citocinas (IL1, IL-6 e IL-10).

### **2.1.3 Intervenções**

#### **Hemorragia**

A hemorragia foi iniciada após a preparação cirúrgica do animal, registro da PAM basal, e cálculo do volume de sangue total ( $VS = 0,06 \times \text{Peso (g)} + 0,77$ ). Em seguida foi aspirado sangue, pelo cateter da artéria carótida direita, para manter a PAM em 45% do valor da PAM basal ( $PAM \text{ basal} \times 0,45$ ). Ao atingir esse valor, aguardou-se 15 minutos (tempo de choque sem reposição). Havendo elevação da PAM acima do valor de 45% da PAM basal, novas amostras de sangue foram retiradas. Os dados da PAM foram anotados em formulário apropriado.

### Reposição volêmica

A reposição volêmica iniciou-se após 15 minutos do início da hemorragia. Foram infundidos *bolus* de 20ml/kg de Ringer lactato, conforme preconizado pelo ATLS® para adulto de 70kg (mantendo a mesma proporção, um rato de 250g recebeu aproximadamente 5ml). O *bolus* foi infundido em 3 minutos. Volumes adicionais de ringer lactato foram infundidos até que a PAM alcançasse os níveis basais  $\pm 5$ mmHg. No grupo 1, imediatamente após a retirada das amostras basais de sangue, foi infundido ringer lactato para manter a PAM no nível basal  $\pm 5$ mmHg. O volume de ringer lactato infundido foi anotado para cada animal.

### Estímulo do nervo vago

O estímulo foi feito após o isolamento entre fios de seda 3-0 (Polysuture®, São Sebastião do Paraíso-MG) e vagotomia, sendo posicionado o eletrodo (*Grass stimulator, Boston, MT, USA*) na extremidade seccionada. No Grupo 3A a estimulação foi feita com o nervo íntegro. Foram realizados sete estímulos elétricos (3.5mA, 5Hz) com duração de 30 segundos cada com intervalos de 5 minutos entre os estímulos (tempo total 35 minutos).

### Amostras finais

As amostras finais foram obtidas após 60 minutos do início do experimento, para realização dos seguintes testes finais:

- Tromboelastometria final;
- Dosagem das citocinas (IL1, IL-6 e IL-10) pelo método ELISA.

### Detalhamento da metodologia dos testes realizados nas amostras obtidas

- **Tromboelastometria:** foi coletado 1 ml de sangue em tubo a vácuo (MiniCollect – Vacuette, Monroe, EUA) contendo citrato como anticoagulante. A tromboelastometria foi realizada por meio do *Coagulation Analyzer* (Pentapharm, Munich, Germany) com temperatura corrigida para 37°C, após ativação da coagulação com cloreto de cálcio em solução fornecida pelo fabricante (Startem®, Pentapharm, Munich, Germany). Os parâmetros tromboelastográficos foram calculados pelo software (Natem®, DyCoDerivAn; Avordusol, Rissov, Denmark).

- **Dosagem das citocinas:** Após a centrifugação das amostras de sangue (3500 rpm x 20 min a 4°C) o sobrenadante foi pipetado em alíquotas de 200µl e armazenado a -20°C. A dosagem sérica foi realizada utilizando o kit ELISA Rat Cytokine Test (Neogen® Corporation, Neogen do Brasil, Indaiatuba, SP).

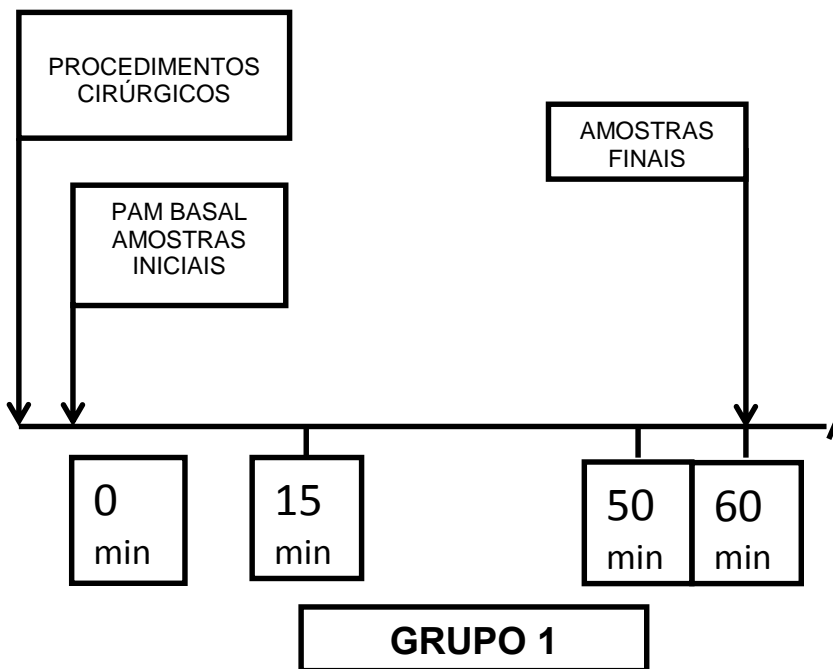
#### Morte dos animais e destino das carcaças

Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por sangria sob anestesia geral e as carcaças foram devidamente descartadas conforme as normas estabelecidas pelo CEUA-UFMG.

Cronograma das intervenções em cada grupo

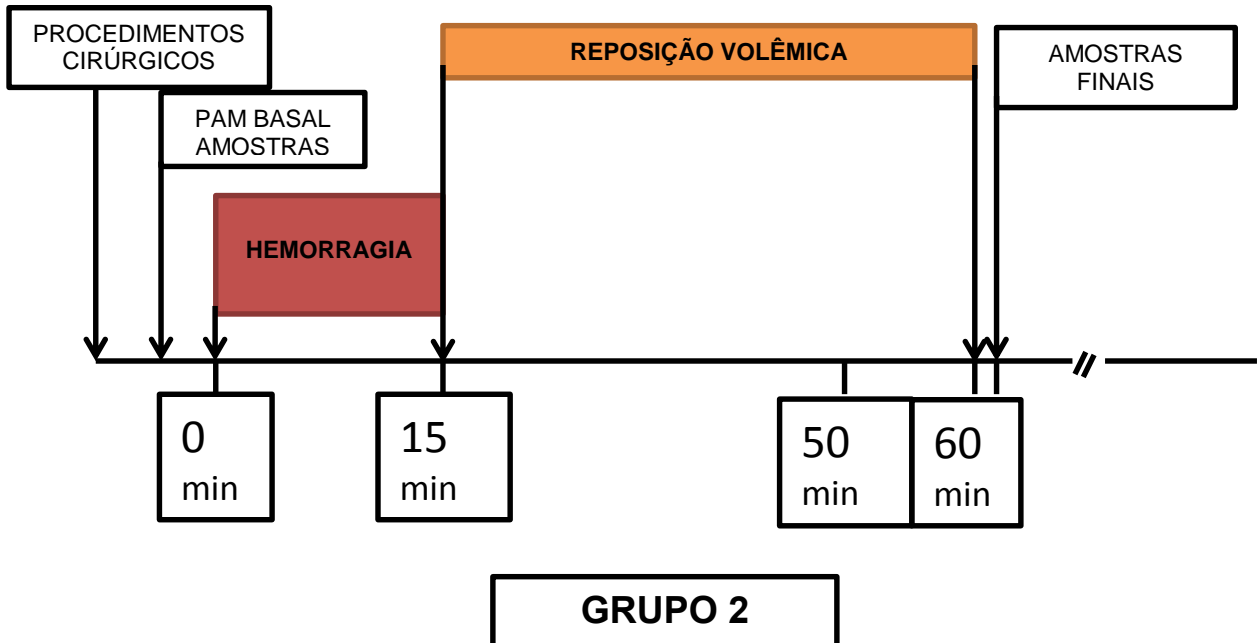
**Grupo 1 (cirúrgico experimental):**

Os animais do Grupo 1 foram submetidos somente aos procedimentos cirúrgicos e as coletas de materiais inicial e final (Fig 1).



**Fig 1:** Cronograma das intervenções no grupo 1. PAM, pressão arterial média. min, tempo em minutos

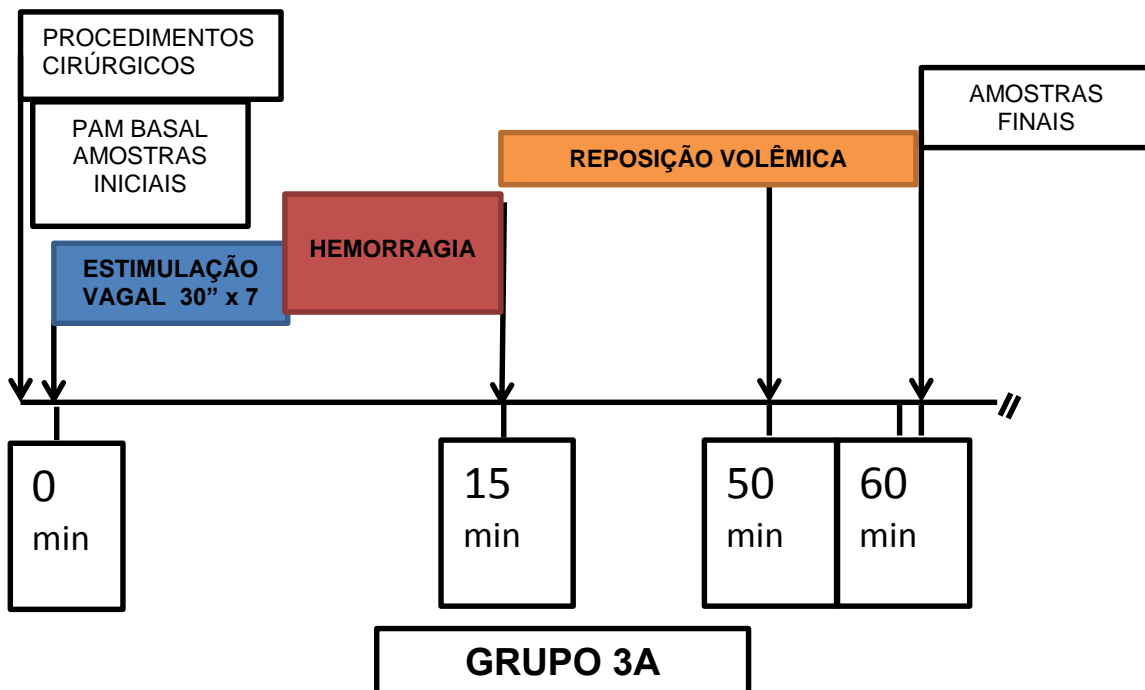
**Grupo 2:** Os animais foram ao choque hemorrágico sem estímulo vagal (Fig 2).



**Fig 2:** Cronograma das intervenções no grupo 2. PAM, pressão arterial média. min, tempo em minutos

**Grupo 3A:**

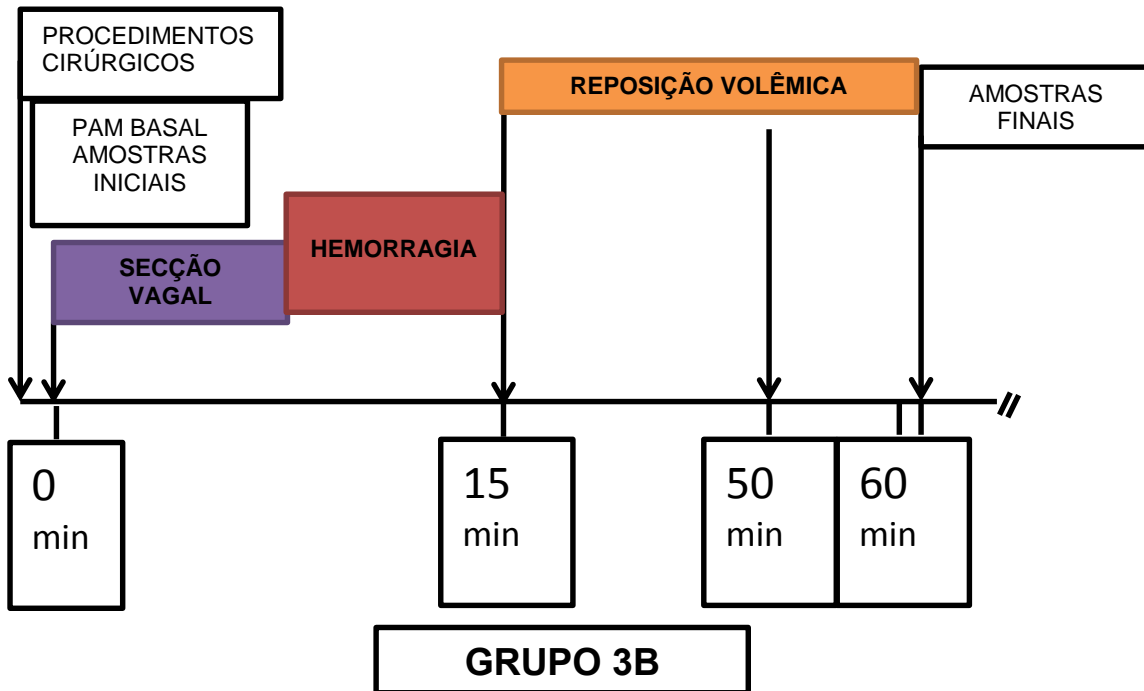
Os animais foram submetidos a todos os procedimentos e o estímulo vagal foi anterior ao choque hemorrágico, com o nervo vago íntegro (Fig 3).



**Fig 3:** Cronograma das intervenções no grupo 3A. PAM, pressão arterial média. min, tempo em minutos. Estimulação vagal 30''x 7, sete ciclos de estímulo vagal com duração de 30 segundos cada.

**Grupo 3B:**

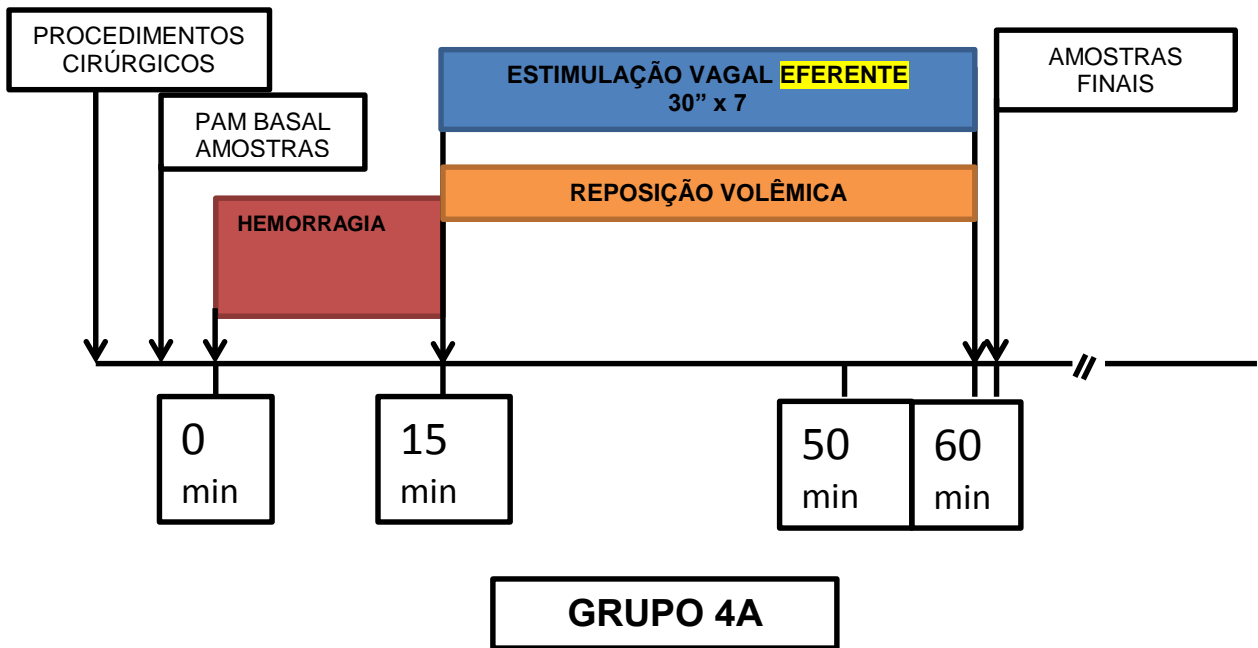
Os animais foram submetidos à secção vagal bilateral imediatamente antes do choque hemorrágico (Fig 4).



**Fig 4:** Cronograma das intervenções no grupo 3B. PAM, pressão arterial média. min, tempo em minutos

**Grupo 4A:**

Os animais foram submetidos à vagotomia e estimulação vagal bilateral no coto eferente 15 minutos após o choque hemorrágico (Fig 5).

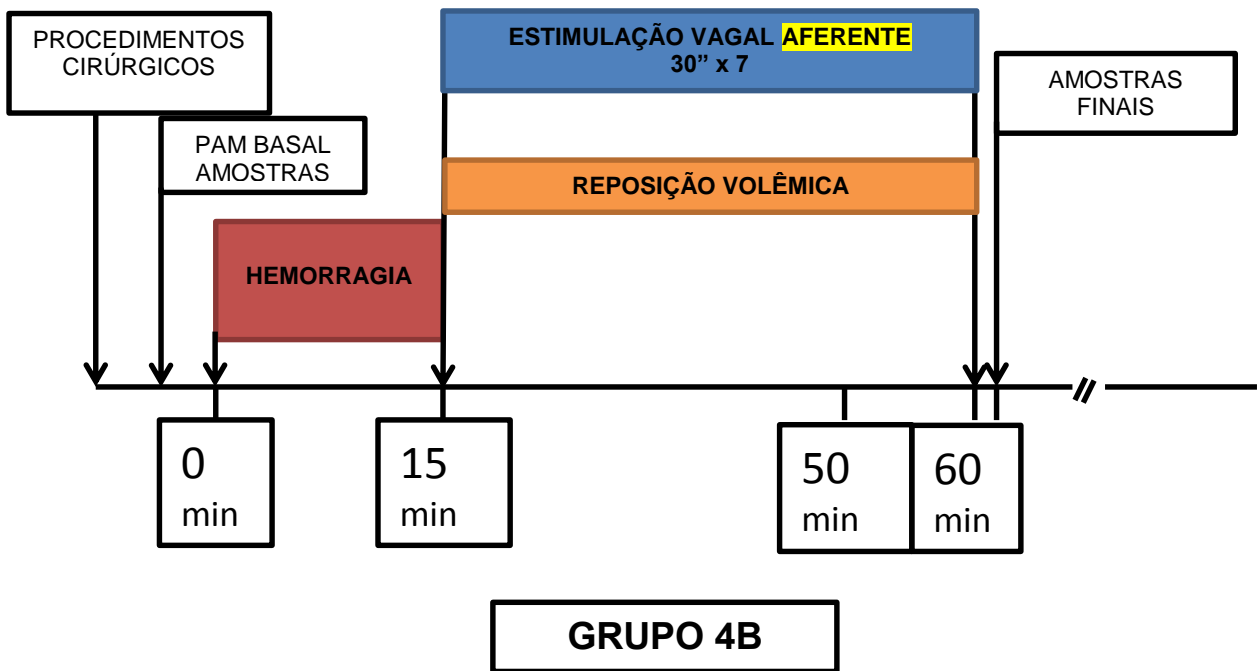


**Fig 5:** Cronograma das intervenções no grupo 4A. PAM, pressão arterial média. min, tempo em minutos. Estimulação vagal 30" x 7, sete ciclos de estímulo vagal com duração de 30 segundos cada.



**Grupo 4B:**

Os animais foram submetidos à vagotomia e estimulação vagal bilateral no coto aferente 15 minutos após o choque hemorrágico (Fig 6).



**Fig 6:** Cronograma das intervenções no grupo 4B. PAM, pressão arterial média. min, tempo em minutos. Estimulação vagal 30"x 7, sete ciclos de estímulo vagal com duração de 30 segundos cada.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos pelas médias dos valores de cada grupo, sendo analisados pelo ANOVA com pós teste de Turkey para comparação de múltiplos grupos e teste *t student* para comparação grupo a grupo. A significância foi determinada para valores de  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

Os dados da variação hemodinâmica foram registrados em todos os grupos e comparados no gráfico abaixo, destacando-se o grupo 2 (choque hemorrágico sem estímulo vagal), grupo 1 (cirúrgico experimental) e o grupo 4A (choque hemorrágico e estímulo vagal eferente). A cervicotomia não produziu alterações significativas na pressão arterial média (PAM) dos animais; do contrário, o choque hemorrágico reduziu significativamente a PAM, que se estabilizou após reposição normotensiva.

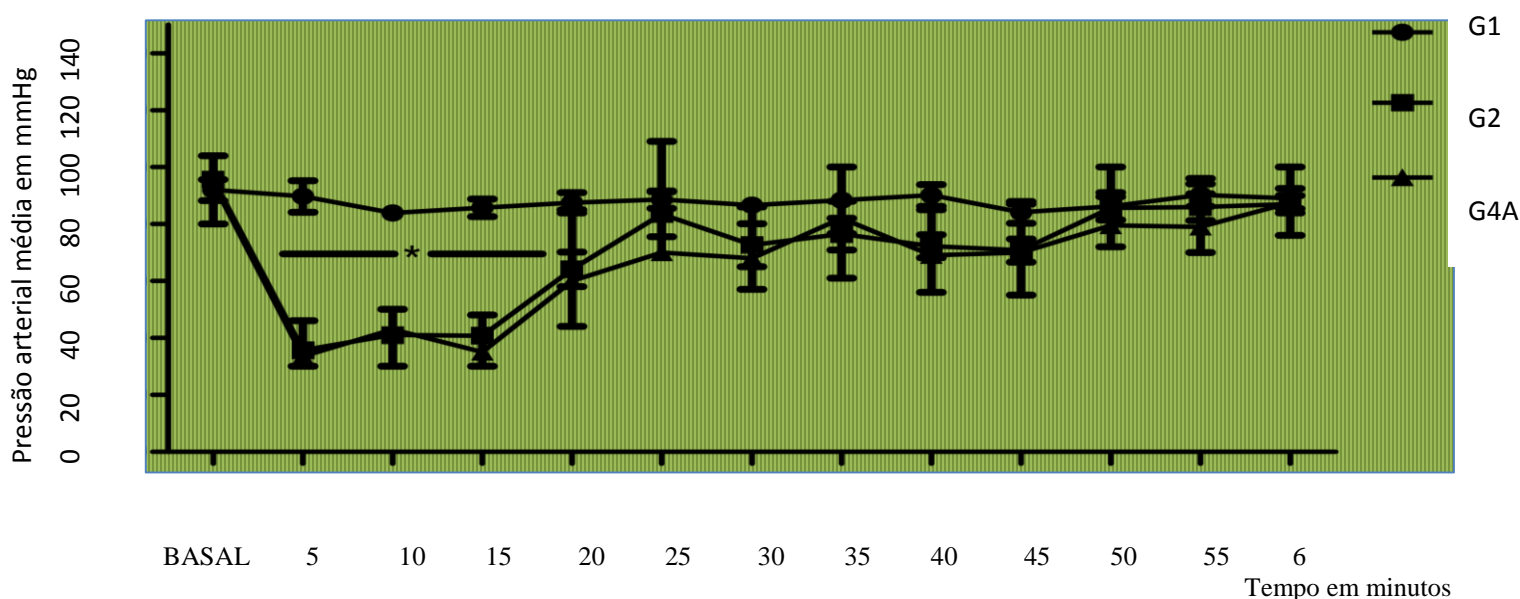


Fig 7: Variação na resposta hemodinâmica entre os grupos 1, 2 e 4A

\*  $p < 0,05$

Foram analisados os seguintes parâmetros de tromboelastometria em todos os grupos do experimento: Tempo de coagulação (*Clotting Time-CT*), que corresponde ao intervalo em segundos entre o início da medição até a formação do coágulo, podendo ser interpretado como início da coagulação, formação da trombina e início do ciclo de polimerização do coágulo. Tempo de formação do coágulo (*Clot formation time-CFT*) – intervalo entre o início da coagulação até que uma consistência mínima de 20 mm seja detectada no coágulo; também pode ser entendida como a polimerização de fibrina ou estabilização do coágulo com trombócitos e fator XIII. Consistência máxima do coágulo (*Maximum clot firmness-MCF*) – traduz a estabilidade do coágulo ou evolução

do processo de polimerização do coágulo pela ação dos trombócitos e do fator XIII<sup>17</sup>. Ângulo *ALFA*( $\alpha$ ), medido, em graus, do ângulo formado na curva de leitura da tromboelastometria entre o CT e o MCF; quantifica a coagulabilidade da amostra, pela medida da força tênsil do coágulo e da clivagem de fibrinogênio em fibrina pela ação da trombina<sup>16</sup>.

#### 4.1 EFEITO DA INTERVENÇÃO CIRÚRGICA NA COAGULAÇÃO \_ GRUPO 1

A intervenção cirúrgica sem choque hemorrágico ou estimulação vagal não produziu diferença significativa entre os valores basais e finais da tromboelastometria, em CT (média basal 253,5, final 189,83, em segundos,  $P>0,05$ ; Fig 7), CFT (média basal 82,83, final 66, em segundos,  $P>0,05$ ; Fig 8), MCF (média basal 59,16, final 63,5, em milímetros,  $P>0,05$ ; Fig 9) e ângulo  $\alpha$  (média basal 73,83, final 76,83, em graus,  $P>0,05$ ; Fig 10).

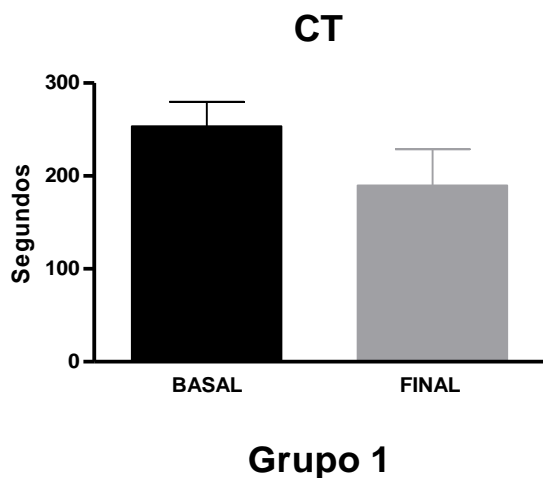


Fig 8: Variação entre os valores basais e finais para CT no grupo 1. CT, início da coagulação, com polimerização incipiente da trombina desde o tempo zero.

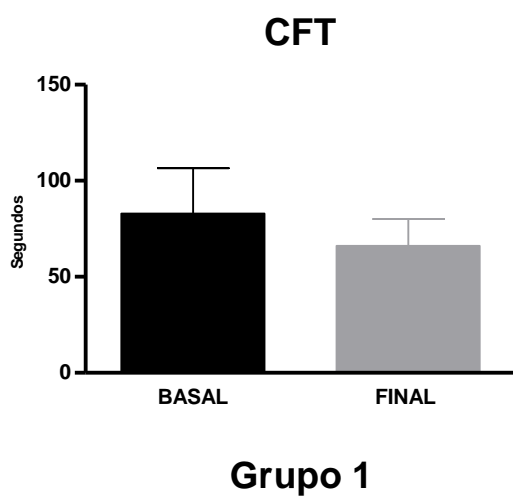


Fig 9: Variação entre os valores basais e finais para CFT no grupo 1. CFT, tempo de formação do coágulo, relacionado à polimerização da fibrina e estabilização do coágulo sob ação do fator XIII.

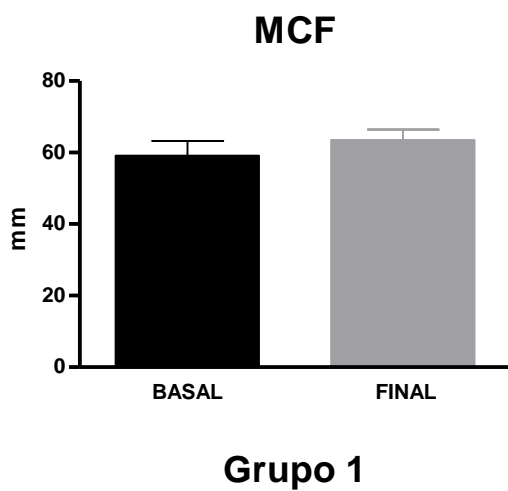


Fig 10: Variação entre os valores basais e finais para MCF no grupo 1. MCF, máxima estabilidade do coágulo ou maior força tênsil.

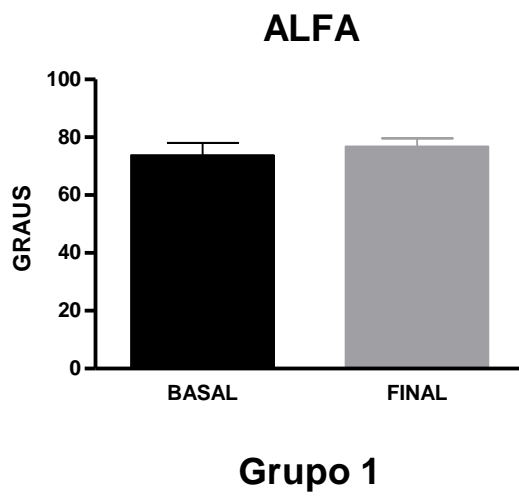


Fig 11: Variação entre os valores basais e finais para ALFA no grupo 1. Alfa, coagulabilidade da amostra medida em graus.

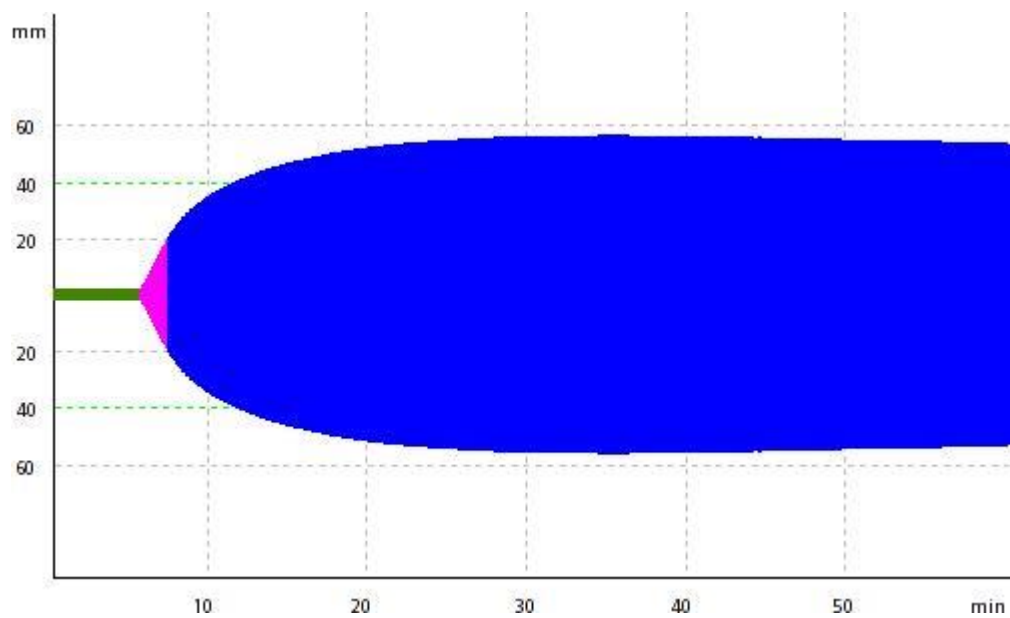


Fig 12: Curva de tromboelastometria do rato 4, grupo 1; amostra inicial

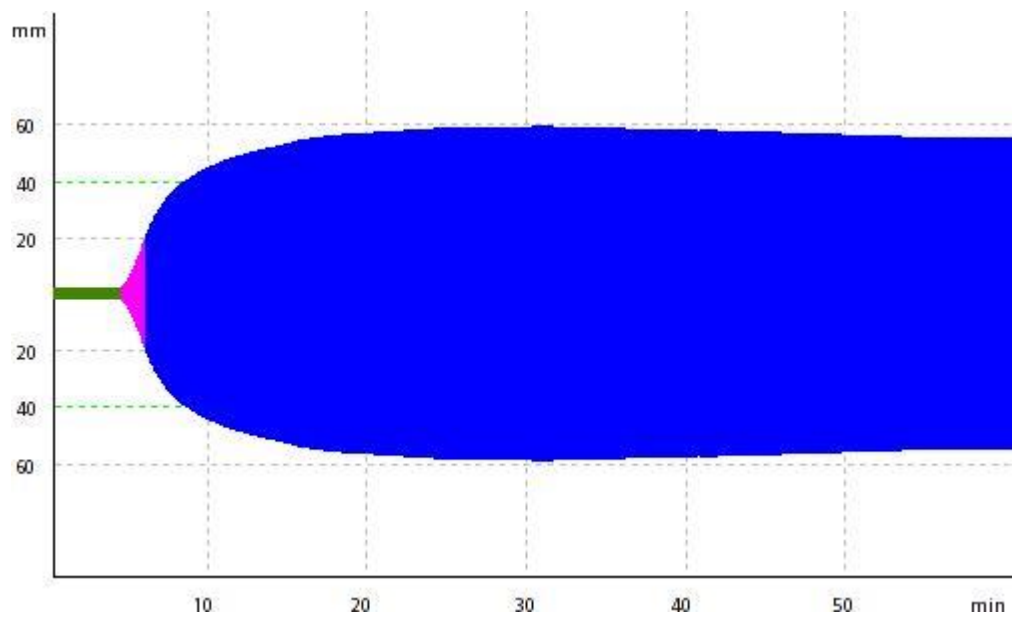


Fig 13: Curva de tromboelastometria do rato 4, grupo 1; amostra final

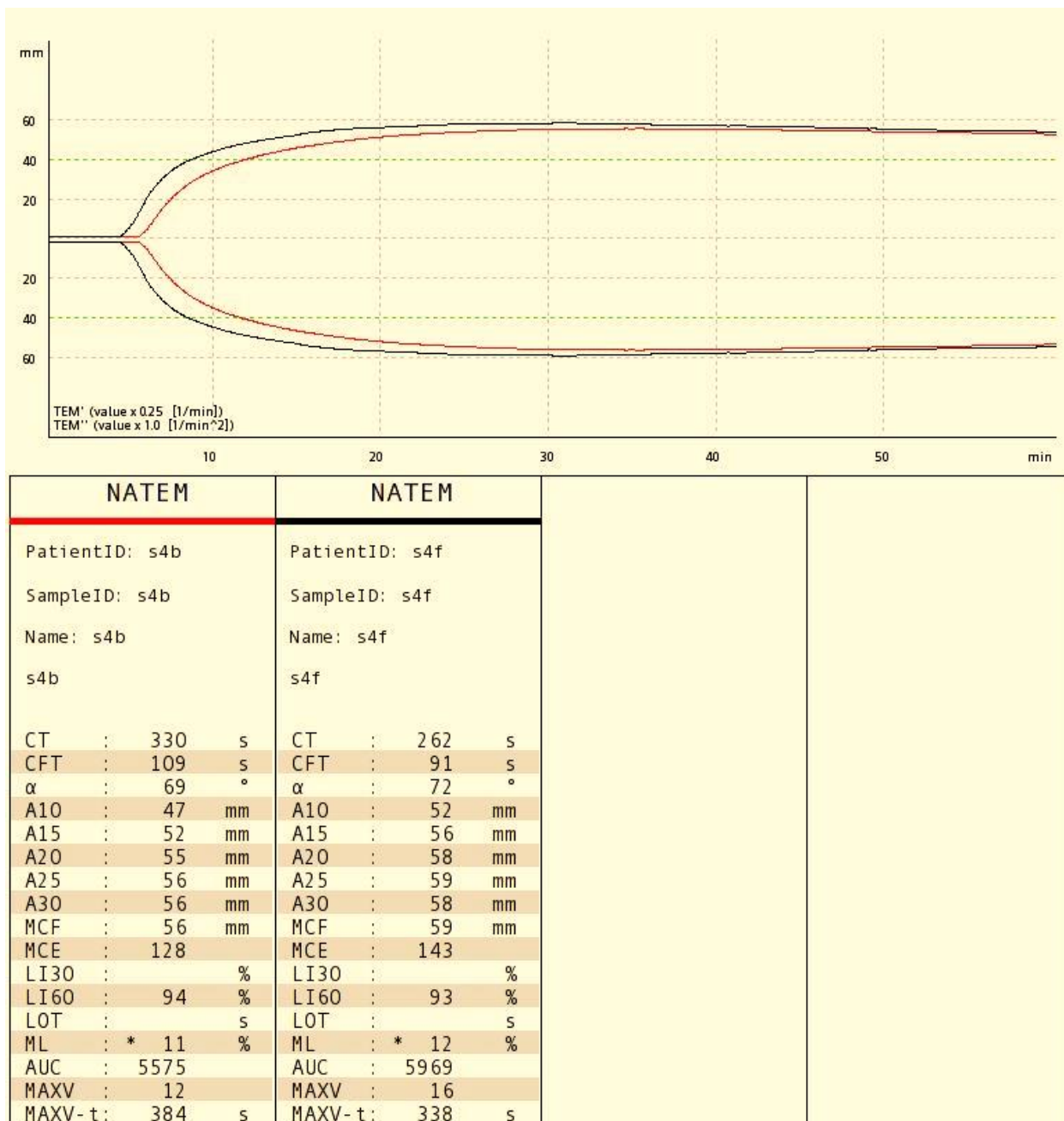
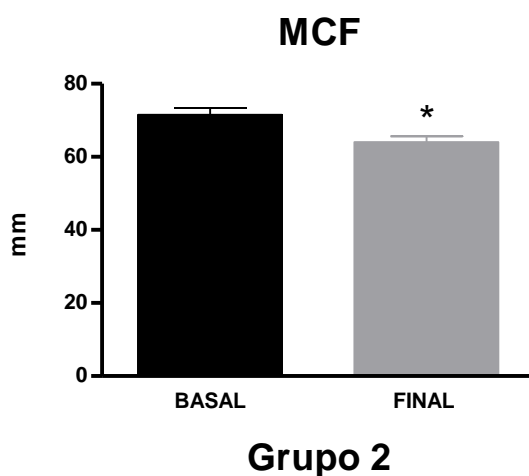


Fig 14: Comparativo entre a tromboelastometria inicial e final do rato 4, grupo 1



#### 4.2 EFEITO DO CHOQUE HEMORRÁGICO, SEM ESTÍMULO VAGAL, NA COAGULAÇÃO – GRUPO 2A

Choque hemorrágico, sem estímulo vagal, resultou em menor firmeza do coágulo, segundo a comparação entre as amostras basais e finais na tromboelastometria para MCF (média basal 71,5, final 64, em milímetros,  $P < 0,05$ ; Fig 14); não houve diferença significativa na comparação de valores basais e finais nos parâmetros CT (média basal 308,33, final 336,33, em segundos,  $P > 0,05$ ; Fig 15), CFT (média basal 78,6 final 93,4, em segundos,  $P > 0,05$ ; Fig 16) e ângulo  $\alpha$  (média basal 75,66 final 73, em graus,  $P > 0,05$ ; Fig 17).



\*  $P < 0,05$

Fig 15: Variação entre os valores iniciais e finais para MCF no grupo 2. MCF, máxima estabilidade do coágulo ou maior força tênsil.

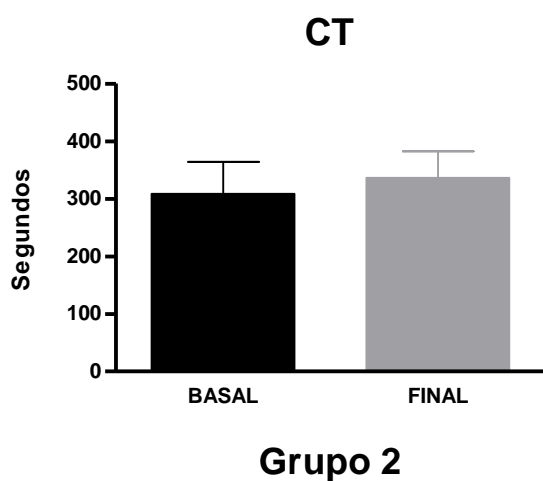


Fig 16: Variação entre os valores basais e finais para CT no grupo 2. CT, início da coagulação, com polimerização incipiente da trombina desde o tempo zero.

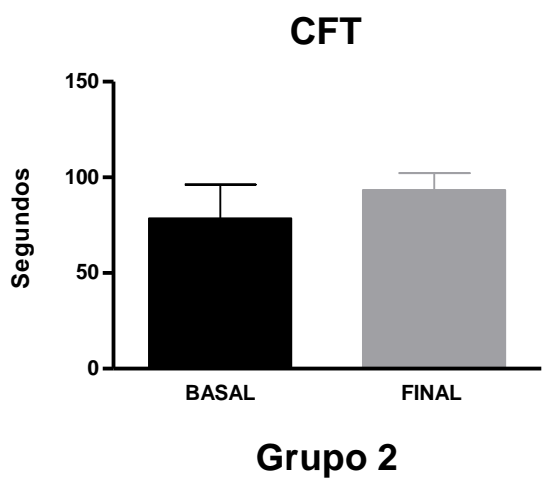


Fig 17: Variação entre os valores basais e finais para CFT no grupo 2. CFT, tempo de formação do coágulo, relacionado à polimerização da fibrina e estabilização do coágulo sob ação do fator XIII.

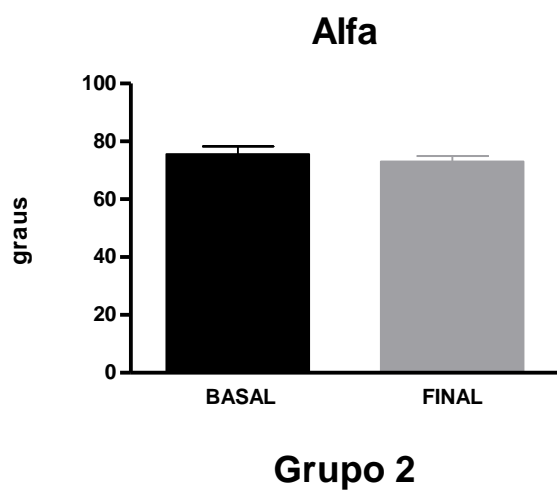


Fig 18: Variação entre os valores basais e finais para Alfa no grupo 2. Alfa, coagulabilidade da amostra medida em graus.

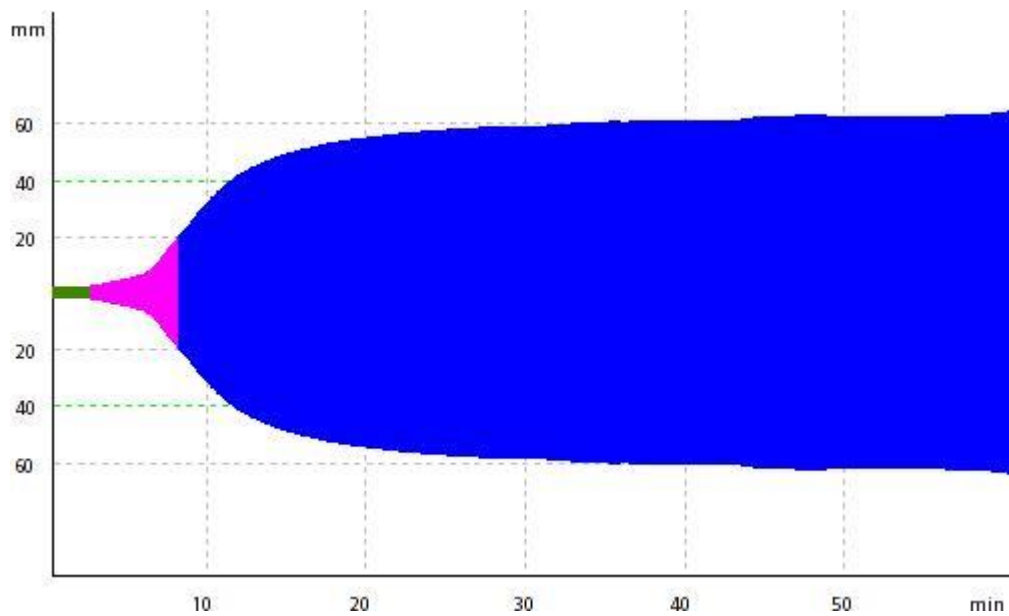
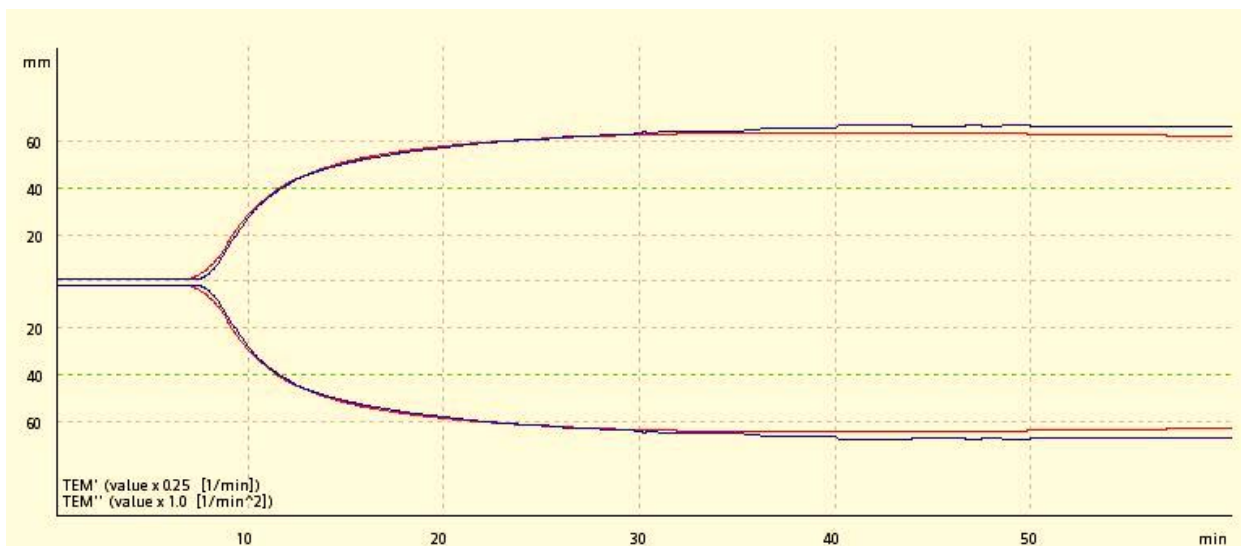


Fig 19: Curva de tromboelastometria do rato 5, grupo 2; amostra inicial



Fig 20: Curva de tromboelastometria do rato 5, grupo 2; amostra final



NATEM			NATEM		
PatientID: g2ar5b			PatientID: g2ar5f		
SampleID: g2ar5b			SampleID: g2ar5f		
Name: g2ar5b			Name: g2ar5f		
g2ar5b			g2ar5f		
CT : 416 s			CT : 448 s		
CFT : 127 s			CFT : 105 s		
$\alpha$ : 67 °			$\alpha$ : 70 °		
A10 : 55 mm			A10 : 55 mm		
A15 : 60 mm			A15 : 60 mm		
A20 : 62 mm			A20 : 63 mm		
A25 : 64 mm			A25 : 65 mm		
A30 : 64 mm			A30 : 66 mm		
MCF : 64 mm			MCF : 67 mm		
MCE : 179			MCE : 207		
LI30 : %			LI30 : %		
LI60 : 96 %			LI60 : 98 %		
LOT : s			LOT : s		
ML : * 8 %			ML : * 6 %		
AUC : 6507			AUC : 6686		
MAXV : 14			MAXV : 14		
MAXV-t : 524 s			MAXV-t : 529 s		

Fig 21: Comparativo entre a tromboelastometria inicial e final do rato 5, grupo 2

### 4.3 EFEITO DO ESTÍMULO VAGAL ANTERIOR AO CHOQUE HEMORRÁGICO – GRUPO 3A

A estimulação vagal não interferiu significativamente na coagulação, quando realizada antes do choque hemorrágico, em todos os parâmetros da tromboelastometria, CT (média basal 331,4, final 348,4, em segundos,  $P>0,05$ ; Fig 21), CFT (média basal 111,83, final 97,83, em segundos,  $p>0,05$ ; Fig 22), MCF (média basal 64, final 57,33, em milímetros,  $p>0,05$ ; fig 23) e ângulo  $\alpha$  (média basal 70,16, final 71,16, em graus,  $p>0,05$ ; fig 24).

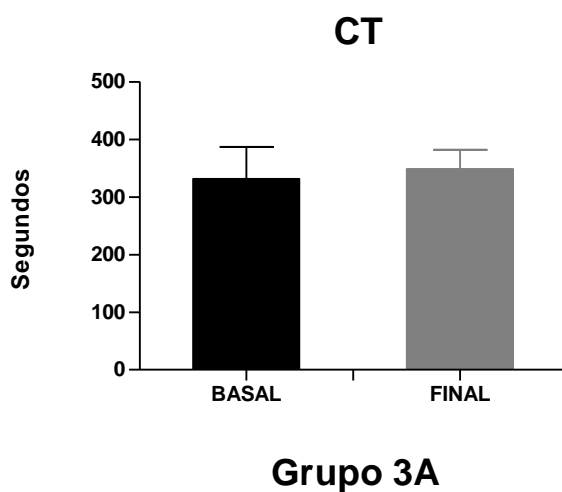


Fig 22: Variação entre os valores iniciais e finais para CT no grupo 3A. CT, início da coagulação, com polimerização incipiente da trombina desde o tempo zero.

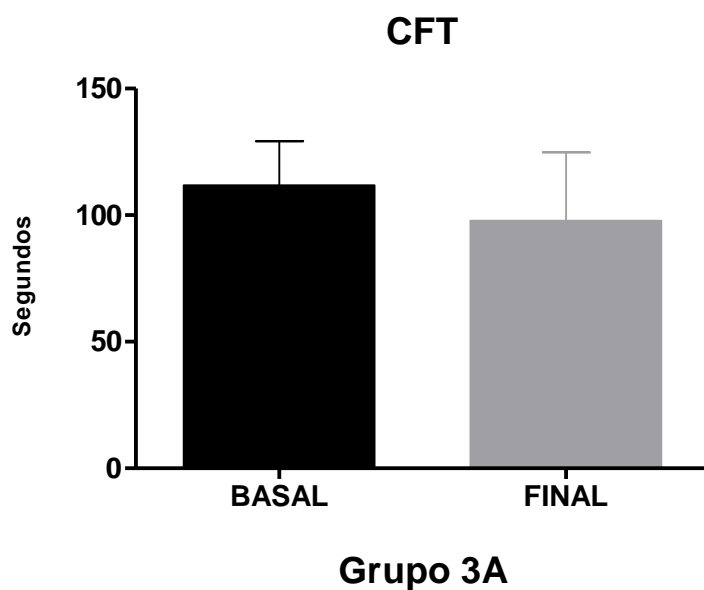


Fig 23: Variação entre os valores basais e finais para CFT no grupo 3A. CFT, tempo de formação do coágulo, relacionado à polimerização da fibrina e estabilização do coágulo sob ação do fator XIII

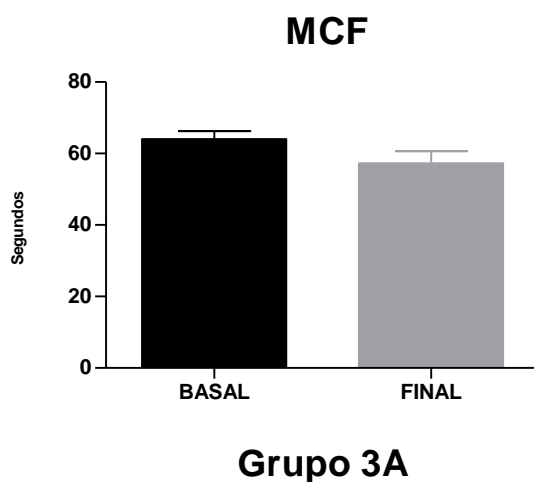


Fig 24: Variação entre os valores iniciais e finais para MCF no grupo 3A. MCF, máxima estabilidade do coágulo ou maior força tênsil.

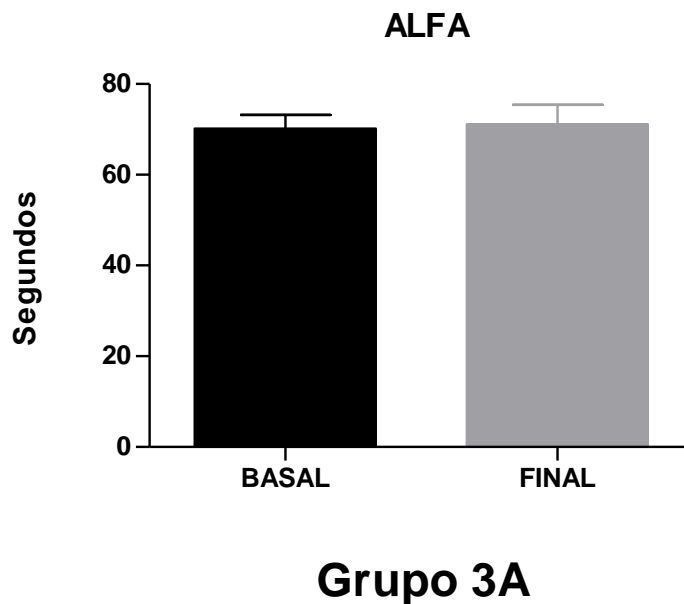


Fig 25: Variação entre os valores iniciais e finais para ALFA no grupo 3A. Alfa, coagulabilidade da amostra medida em graus.

#### 4.4 EFEITO DA SECÇÃO VAGAL BILATERAL ANTERIOR AO CHOQUE HEMORRÁGICO- GRUPO 3B

Os resultados deste grupo demonstraram que a secção vagal bilateral antes do choque não produz efeito sobre a coagulação nos parâmetros de tromboelastometria CT (média basal 334,5, final 335, em segundos,  $P > 0,05$ ; Fig 25), CFT (média basal 116,5, final 110,66, em segundos,  $p > 0,05$ ; Fig 26), MCF (média basal 64,16, final 57,66, em milímetros,  $p > 0,05$ ; fig 27) e ângulo  $\alpha$  (média basal 68,5, final 68,66, em graus,  $p > 0,05$ ; Fig 28).



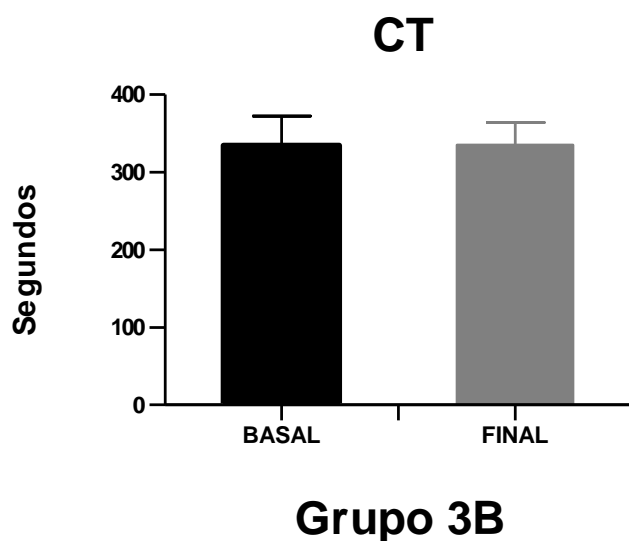


Fig 26: Variação entre os valores iniciais e finais para CT no grupo 3B. CT, início da coagulação, com polimerização incipiente da trombina desde o tempo zero.

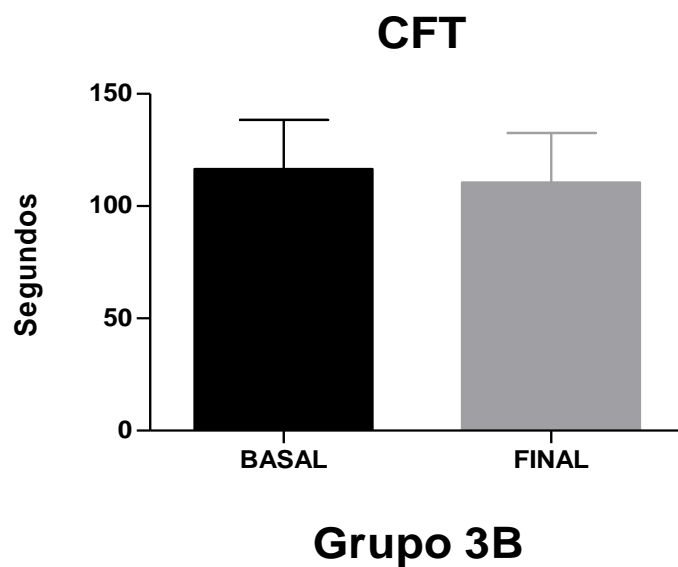


Fig 27: Variação entre os valores iniciais e finais para CFT no grupo 3B. CFT, tempo de formação do coágulo, relacionado à polimerização da fibrina e estabilização do coágulo sob ação do fator XIII.

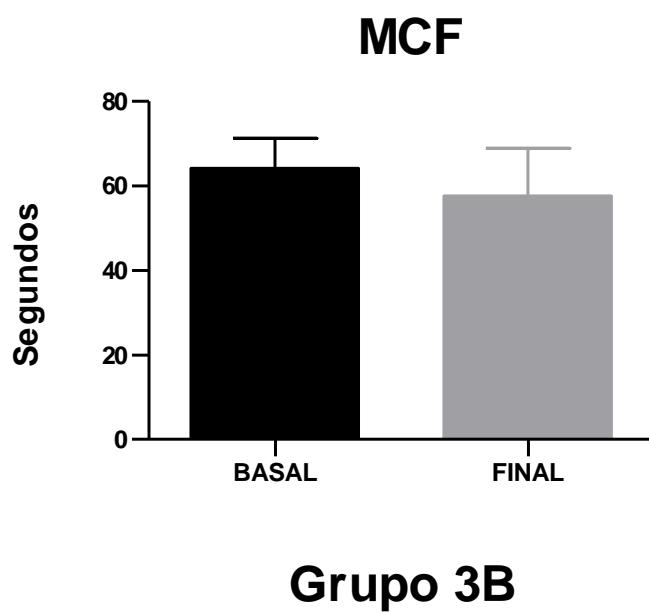


Fig 28: Variação entre os valores iniciais e finais para MCF no grupo 3B. MCF, máxima estabilidade do coágulo ou maior força tênsil.

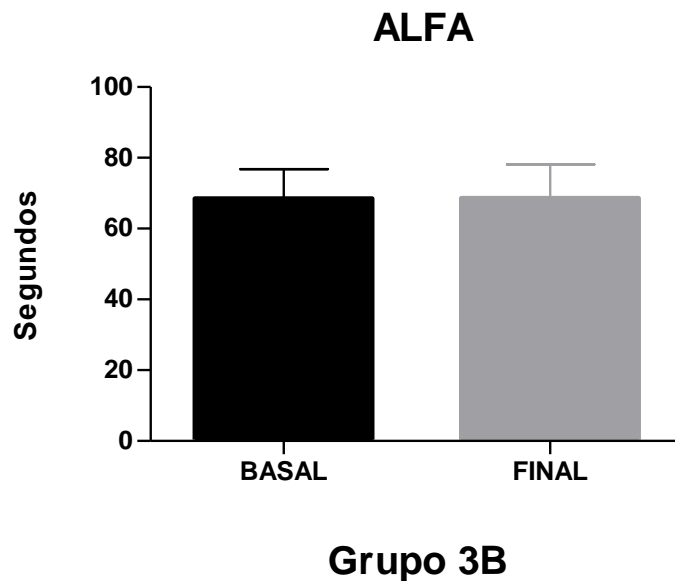
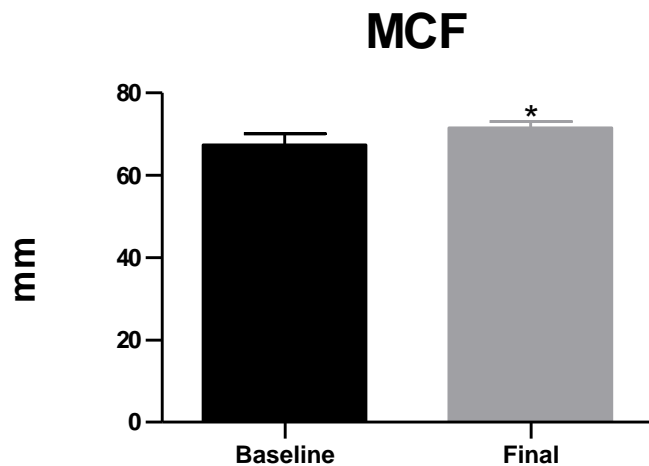


Fig 29: Variação entre os valores iniciais e finais para ALFA no grupo 3B. Alfa, coagulabilidade da amostra medida em graus.

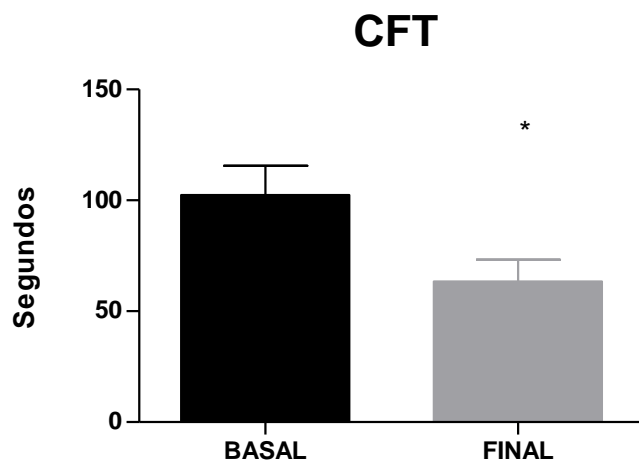
#### 4.5 EFEITO DO ESTÍMULO VAGAL EFERENTE APÓS CHOQUE HEMORRÁGICO-GRUPO 4A

Estímulo vagal no coto eferente, após choque hemorrágico, produziu alterações significativas na coagulação, segundo resultados de tromboelastometria nos parâmetros MCF (média basal 64,16, final 57,66, em milímetros,  $p < 0,05$ ; fig 29), CFT (média basal 102,4, final 63,4, em segundos,  $p < 0,05$ ; Fig 30) e ângulo  $\alpha$  (média basal 72,66, final 78,66, em graus,  $p < 0,05$ ; Fig 31).



### Grupo 4A

Fig 30: Variação entre os valores iniciais e finais para MCF no grupo 4A. MCF, máxima estabilidade do coágulo ou maior força tênsil. \*  $P < 0,05$



### Grupo 4A

Fig 31: Variação entre os valores iniciais e finais para CFT no grupo 4A. CFT, tempo de formação do coágulo, relacionado à polimerização da fibrina e estabilização do coágulo sob ação do fator XIII.

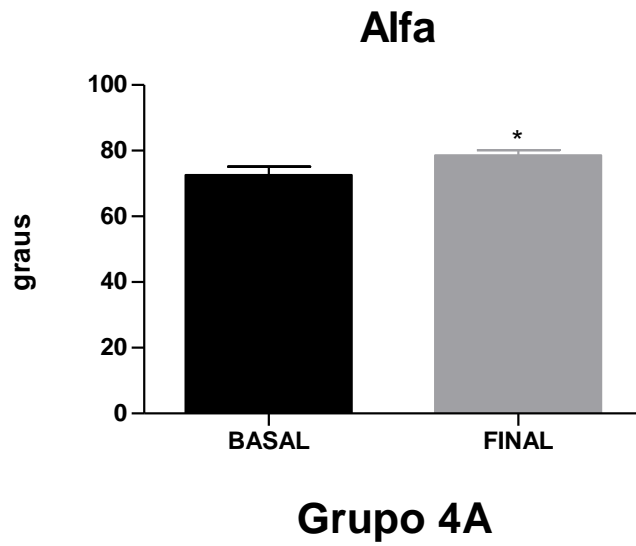


Fig 32: Variação entre os valores iniciais e finais para ALFA no grupo 4A. Alfa, coagulabilidade da amostra medida em graus.

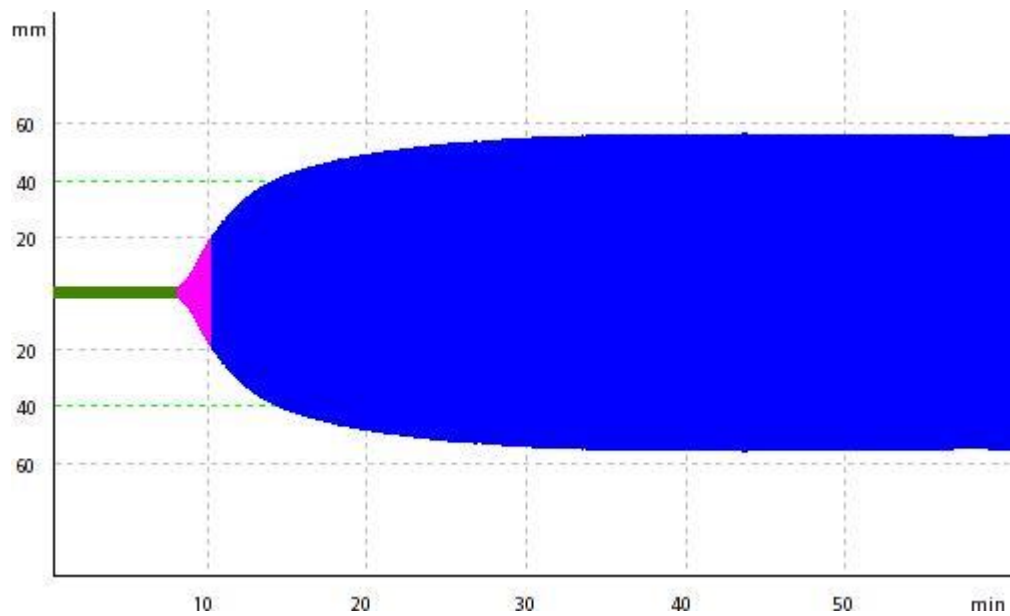


Fig 33: Curva de tromboelastometria do rato 5, grupo 4A; amostra inicial

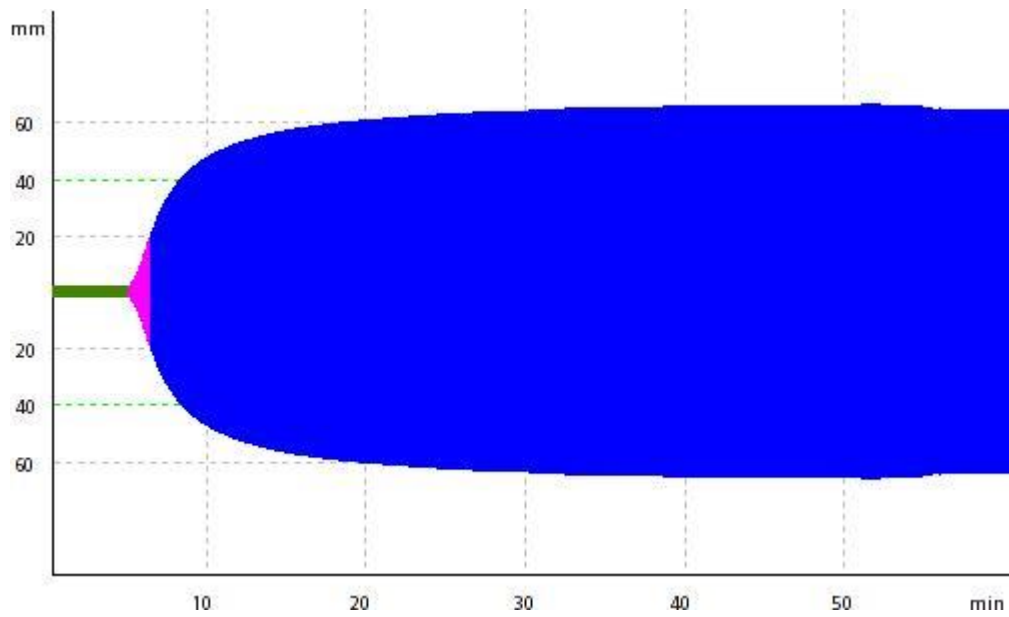


Fig 34: Curva de tromboelastometria do rato 5, grupo 4A; amostra final

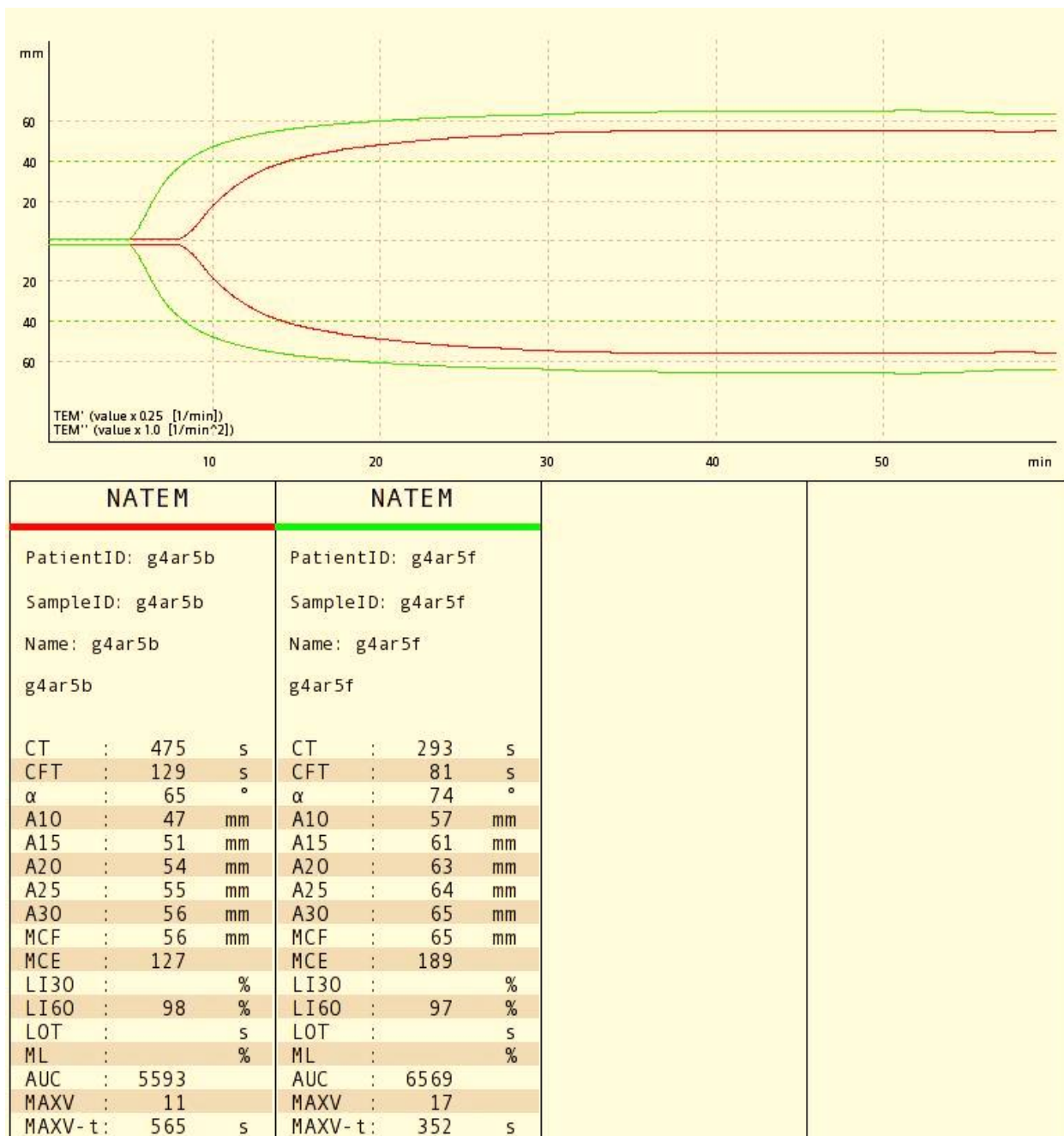


Fig 35: Comparativo entre a tromboelastometria basal e final do rato 5, grupo 4A

#### 4.6 EFEITO DO ESTÍMULO VAGAL AFERENTE APÓS CHOQUE HEMORRÁGICO-GRUPO 4B

Estímulo vagal no coto aferente, após choque hemorrágico, não produziu alterações significativas na coagulação, segundo resultados de tromboelastometria nos parâmetros CT (média basal 232,5, final 168,66, em milímetros,  $p>0,05$ ; Fig 35), CFT (média basal 72, final 52,16, em segundos,  $p>0,05$ ; Fig 36) MCF (média basal 64,16, final 57,66, em milímetros,  $p>0,05$ ; fig 37) e ALFA (média basal 75,16, final 79,33, em graus,  $p>0,05$ ; Fig 38).

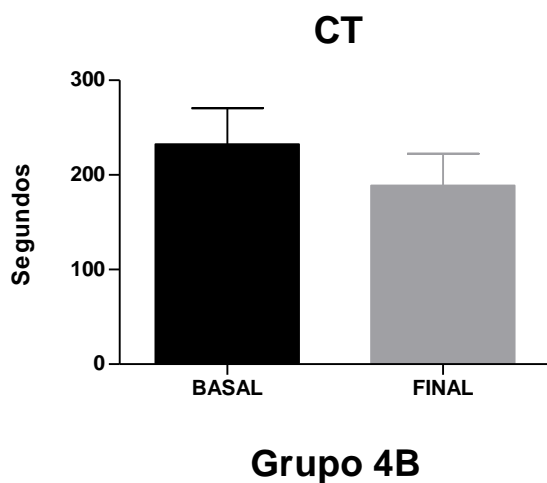


Fig 36: Variação entre os valores iniciais e finais para CT no grupo 4B. CT, início da coagulação, com polimerização incipiente da trombina desde o tempo zero.



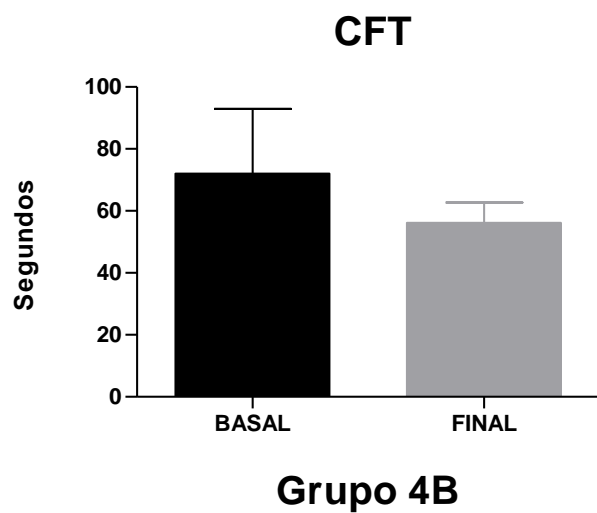


Fig 37: Variação entre os valores iniciais e finais para CFT no grupo 4B. CFT, tempo de formação do coágulo, relacionado à polimerização da fibrina e estabilização do coágulo sob ação do fator XIII.

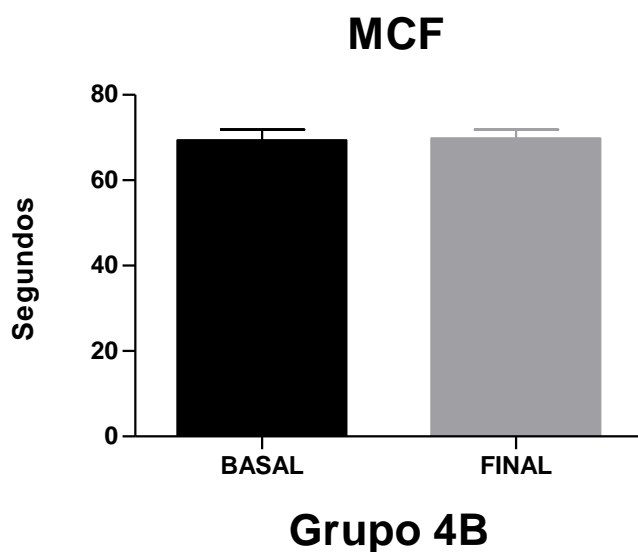


Fig 38: Variação entre os valores iniciais e finais para MCF no grupo 4B. MCF, máxima estabilidade do coágulo ou maior força tênsil.

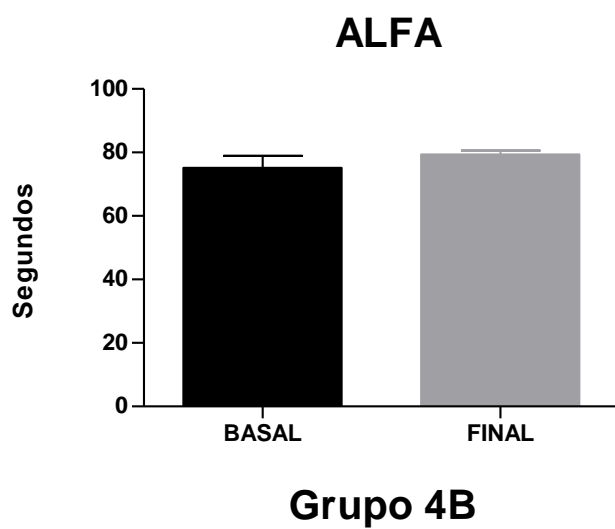


Fig 39: Variação entre os valores iniciais e finais para ALFA no grupo 4B. Alfa, coagulabilidade da amostra medida em graus.

## Citocinas

A citocina IL-1 foi dosada nas amostras basais e finais de cada grupo; IL-6 e IL-10 foram dosadas apenas no grupo 4A. Não houve diferença significativa na produção de IL-1 após a preparação cirúrgica (média basal 4,24, final 4,49, em pg/ml,  $P>0,05$ ; Fig 39), assim como no choque hemorrágico sem estimulação (média basal 8,56, final 22,62, em pg/ml,  $P>0,05$ ; Fig 40). Não houve diferença significativa na produção de IL-1 após estímulo vagal aferente (média basal 5,34, final 2,74, em pg/ml,  $P>0,05$ ; Fig 42). Por outro lado, estímulo vagal eferente reduziu significativamente a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 (média basal 3,17, final 0,64, em pg/ml,  $P=0,019$ ; Fig 41), enquanto aumentou significativamente a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (média basal 26,31, final 40,18, em pg/ml,  $P=0,03$ ; Fig 44). A produção de IL-6 não foi significativamente alterada pelo estímulo vagal eferente (média basal 31,26, final 21,27, em pg/ml,  $P=0,03$ ; Fig 43).

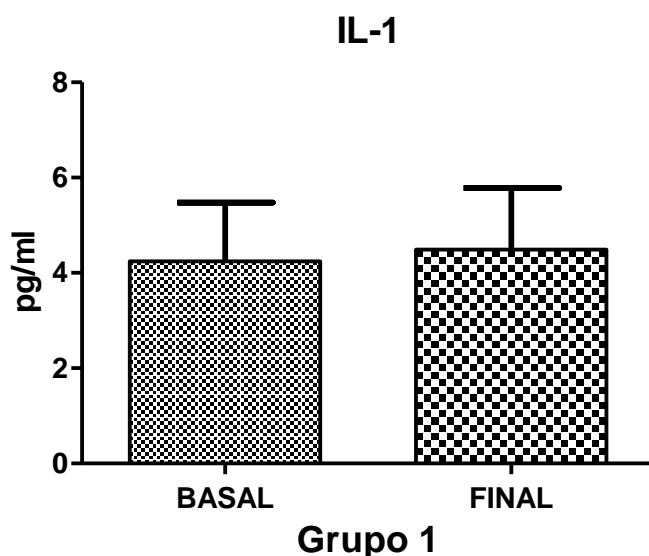


Fig 40: Variação entre os valores iniciais e finais para IL-1 no grupo 1 em picogramas por ml.

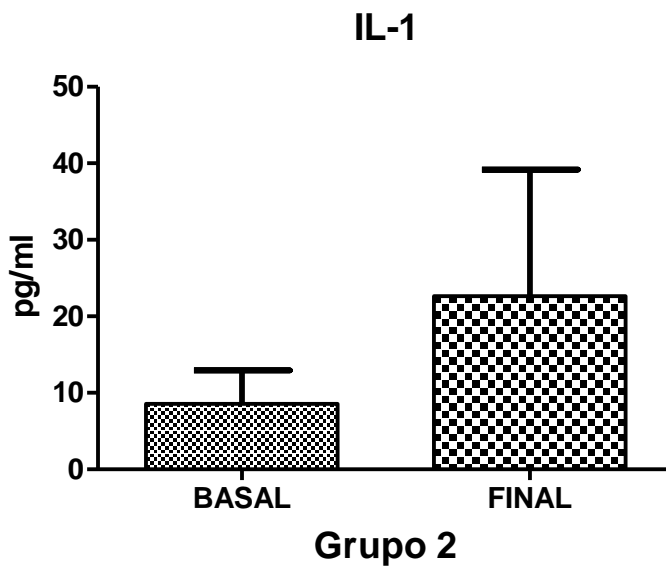
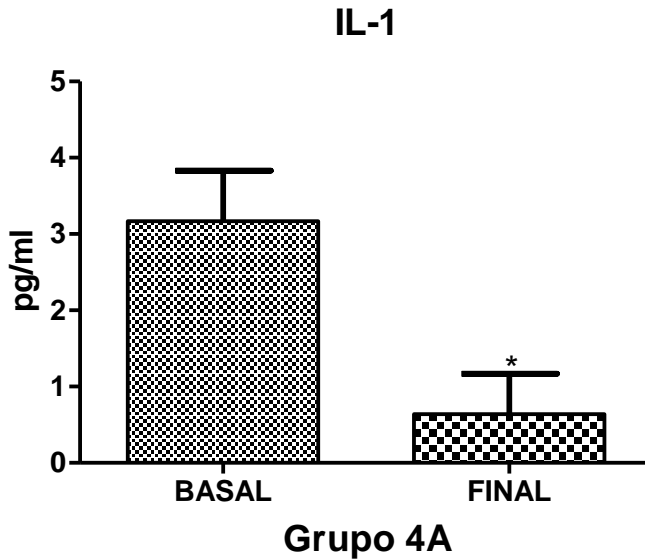


Fig 41: Variação entre os valores iniciais e finais para IL-1 no grupo 2, em pictogramas por ml.



\* P < 0,05

Fig 42: Variação entre os valores iniciais e finais para IL-1 no grupo 4A, em pictogramas por ml.

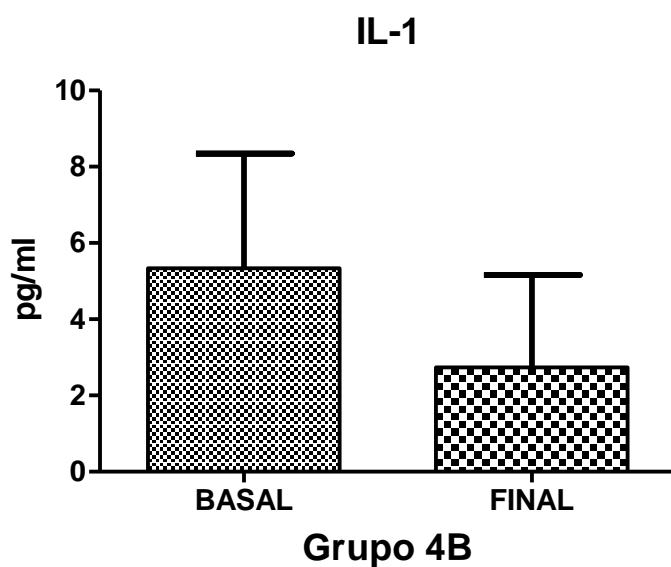


Fig 43: Variação entre os valores iniciais e finais para IL-1 no grupo 4B, em picogramas por ml.

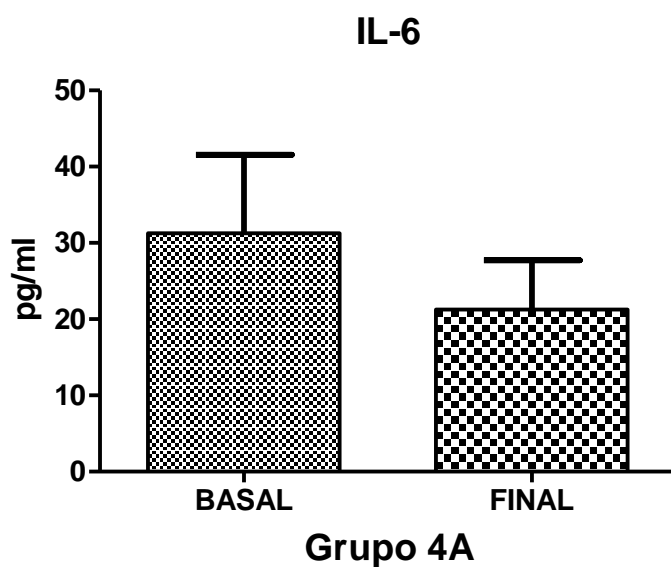
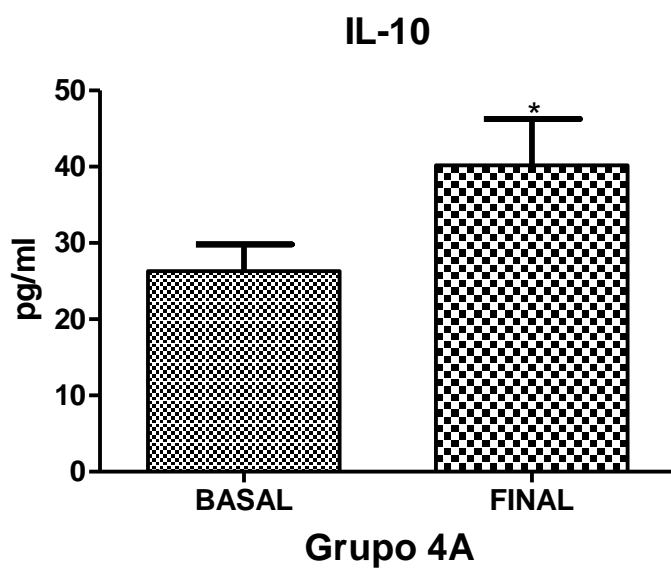


Fig 44: Variação entre os valores iniciais e finais para IL-6 no grupo 4A, em picogramas por ml.



\* P < 0,05

Fig 45: Variação entre os valores iniciais e finais para IL-10 no grupo 4A, em picogramas por ml.

## 5. DISCUSSÃO

A via colinérgica anti-inflamatória é uma resposta fisiológica já demonstrada em diversos modelos experimentais<sup>6-10,22</sup>. Em função do caráter sistêmico da resposta inflamatória pós-choque hemorrágico, é fundamental a compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos, proporcionando uma perspectiva de tratamento para alterações determinantes de altos índices de morbimortalidade, como as alterações de coagulação pós-traumáticas<sup>1</sup>. As alterações da coagulação pós-choque hemorrágico são, classicamente, monitoradas por testes de rotina no plasma como o tempo de tromboplastina ativada (tpa) e o tempo de protrombina (tp). Contudo, são incapazes de prever alterações inerentes ao choque hemorrágico por detectarem uma pequena porção de trombina formada no início da coagulação<sup>25</sup>. O conhecimento do modelo celular na cascata de coagulação levou ao desenvolvimento da análise viscoelástica de início da coagulação, representada pela tromboelastografia e tromboelastometria<sup>25</sup>. Ambos procedimentos produzem representação gráfica da formação do coágulo e subsequente lise. A vantagem destes testes está na redução da influência de elementos do plasma como plaquetas, hemácias e leucócitos sobre a coagulação, além de permitir análise do processo em diferentes etapas, em curto espaço de tempo, permitindo decisões rápidas, como o tipo de elemento a ser transfundido em uma sala de trauma<sup>25</sup>. Este estudo relacionou a estimulação vagal às alterações da coagulação, presentes no choque hemorrágico, diretamente afetadas pela resposta inflamatória<sup>2</sup>. As citocinas exercem papel fundamental na resposta inflamatória sistêmica desencadeada pelo trauma, produzindo desequilíbrio na hemostasia. Neste processo, ocorre disfunção endotelial das células, como resultado da disfunção inflamatória; estudos prévios demonstram a função da syndecan-1, um componente proteoglicano do glicocalix celular endotelial, propiciando uma modulação da resposta inflamatória e depuração de citocinas<sup>27-29</sup>. Corroborando esta hipótese, resultados de pacientes vítimas de choque hemorrágico traumático demonstram uma relação inversamente proporcional entre syndecan-1 e interferon- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e diretamente proporcional com IL-10<sup>30</sup>. Da mesma forma, o presente estudo demonstrou aumento de IL-10 e redução de IL-1 $\beta$  após estimulação vagal.

Como a inflamação pode causar tanto a exacerbação da coagulação quanto a inibição, pode-se inferir que a estimulação vagal propicia um balanço hemostático, que em última análise resulta na melhora da coagulação, evidenciada neste estudo pela melhora na cinética de formação do coágulo e maior firmeza do coágulo. De acordo com estudos anteriores, IL-10 reduz a ativação do NF- $\kappa$ B, expressão da molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, em um mecanismo positivo de retroalimentação<sup>31,32</sup>. Assim, níveis aumentados de IL-10 e reduzidos de IL-1 $\beta$ , após estimulação vagal, podem ter reduzido hemorragia provocada pela disfunção endotelial e ainda contribuído para melhor hemostasia, segundo resultados do presente estudo.

Os resultados obtidos produzem informações adicionais, quando comparados a outro trabalho recente sobre hemostasia e estimulação vagal<sup>21</sup>. No presente estudo foi produzido choque hemorrágico mais intenso, resultando em hipotensão significativa, atingindo níveis importantes para resposta inflamatória vigorosa. Obteve-se, ainda, como em outros trabalhos a evidência de que estimulação vagal eferente não produz disfunção cardiovascular<sup>33-36</sup>.

### 5.1 PREPARAÇÃO CIRÚRGICA E COAGULAÇÃO

O grupo 1 foi executado com o intuito de demonstrar a pouca influência da preparação cirúrgica experimental nos resultados. Neste sentido, a ausência de diferença significativa entre resultados basais e finais, na tromboelastometria, demonstra que a cervicotomia, isoladamente, não é capaz de causar alterações na coagulação. Provavelmente, há poucos estímulos pró-inflamatórios nesses animais.

### 5.2 CHOQUE HEMORRÁGICO E COAGULAÇÃO

Por outro lado, choque hipovolêmico com reposição normotensiva, sem estimulação vagal (grupo 2) induz à piora da coagulação na vigência da hemorragia. Ocorreu redução média de 7,5 mm nos valores do MCF, demonstrando menor força tênsil do coágulo. Isto demonstra a eficácia do sangramento neste modelo, alterando a coagulação possivelmente pela intensa resposta inflamatória<sup>1,3</sup>. Outro resultado importante deste grupo, foi o aumento da produção da IL-1 após o



choque hemorrágico, apesar de não haver significância estatística (possivelmente pelo desvio padrão alto), permitindo, contudo, especular-se que a resposta inflamatória se intensificou após o choque hemorrágico. No trauma associado ao choque hemorrágico, observa-se pelo menos seis elementos associados às alterações da coagulação: lesão tecidual, choque, hemodiluição, hipotermia, acidemia e inflamação. O choque hemorrágico, com ou sem reposição volêmica é responsável por induzir à maior degradação de fibrina<sup>24</sup>. A deficiência de fatores de coagulação por hemorragia grave (perda igual ou maior que 40% da volemia) prejudica a formação de trombina e piora a força tênsil do coágulo (MCF)<sup>25</sup>.

### 5.3 VAGO SECCIONADO: ESTÍMULO VAGAL DISTAL E COAGULAÇÃO

Os resultados do grupo 4A demonstram que a estimulação bilateral do coto eferente vagal após choque hemorrágico produz alterações tendendo à melhora da coagulação. Houve redução significativa do CFT na amostra final ( $p < 0,05$ ). O parâmetro CFT (do inglês *clot formation time*) caracteriza a consolidação da formação do coágulo (cujo início é medido pelo CT, do inglês *clotting time*). Neste período, ocorrem alterações estruturais precipitadas pela interação do fator VII ativado (VIIa) com o fator tecidual, exposto após lesão do endotélio<sup>26</sup>. A melhora na coagulação do grupo 4A pode ser atribuída à ação da via anti-inflamatória colinérgica, onde o nervo vago é considerado elemento chave na resposta inflamatória<sup>9</sup>. Neste mecanismo, ocorre uma inibição das citocinas pró-inflamatórias (principalmente IL-1 e TNF  $\alpha$ ) após interação da acetilcolina com receptores nicotínicos, subunidade  $\alpha$ -7 ( $\alpha$ 7-AchR), localizados nos macrófagos, principalmente no baço e fígado. Todo este processo é deflagrado por retroalimentação das vias aferentes vagais até o núcleo motor dorsal cerebral, estimuladas pelo desequilíbrio da homeostase após injúria tecidual, como no sangramento de grandes vasos<sup>9</sup>. Deve ser observado que no grupo 4A houve estimulação do coto distal do nervo vago o que corrobora experimentos anteriores demonstrando a efetividade da via eferente como inibidora da resposta inflamatória<sup>16,20</sup>. A estimulação vagal distal ainda produziu aumento médio superior a 4 mm ( $p < 0,05$ ) no MCF (*maximum clot firmness*), demonstrando estabilização do coágulo após grande quantidade de trombina ser liberada pela atividade plaquetária, sob influência dos fatores XIII e XIIIa; pode-se dizer que a estimulação vagal produziu um coágulo mais firme ou com maior força tênsil<sup>26</sup>. Finalmente, estimulação vagal distal produziu aumento significativo do ângulo alfa ( $p < 0,05$ ), traduzindo antecipação no pico de ação da trombina

e conseqüente aumento de força e estabilidade do coágulo<sup>26</sup>. Ocorreu aumento médio de 36 graus na comparação entre os valores finais e basais.

A dosagem de citocinas tem grande importância na correlação entre estímulo vagal eferente e melhora da coagulação. Houve diminuição da produção de IL-1 e aumento na produção de IL-10 neste grupo. Deste modo, demonstrou-se a ação da via colinérgica anti-inflamatória em todos os segmentos, desde a modulação da resposta inflamatória até a resultante influência sobre a coagulação no choque hemorrágico. De fato, a dosagem das citocinas reforçou a ação da estimulação vagal sobre a coagulação, comprovando a relação direta entre resposta inflamatória e coagulopatia, modulada pelo nervo vago. Por ter sido feita exclusivamente no grupo 4A, a dosagem de IL-10 não serve como parâmetro de modulação anti-inflamatória da estimulação vagal neste trabalho; mas permite especular que a modulação se dá tanto pela inibição da inflamação (neste caso, com redução significativa de IL-1, pós-estimulação eferente e tendo sido feitas dosagens em todos os grupos) quanto pelo estímulo de produção de citocinas anti-inflamatórias. Os resultados obtidos reforçam a importância da pesquisa molecular, determinando os agentes celulares envolvidos na transcrição das citocinas e possivelmente afetados pela estimulação vagal, apontando para aplicabilidade clínica efetiva como tratamento em nível molecular dos distúrbios da coagulação<sup>19</sup>.

#### 5.4 VAGO SECCIONADO: ESTÍMULO VAGAL PROXIMAL E COAGULAÇÃO

O grupo 4B não demonstrou efeito da estimulação vagal de fibras aferentes sobre a coagulação. De fato, estudos anteriores confirmaram a eficácia da estimulação distal, provavelmente por envolver a maioria das fibras eferentes, que estimulam a liberação da acetilcolina em nível celular<sup>9,13,16,19</sup>. Os resultados neste grupo comprovam a teoria da via colinérgica anti-inflamatória onde a ação aferente do nervo vago está relacionada à sinalização, iniciada pela liberação de fatores teciduais, no núcleo dorsal do vago<sup>10</sup>.

### 5.5 VAGO ÍNTEGRO: ESTÍMULO VAGAL BILATERAL, PRÉVIO AO CHOQUE HEMORRÁGICO

A estimulação vagal prévia ao choque, com vago íntegro não produziu diferença sobre a coagulação. Estudo anterior demonstrou ação da estimulação prévia sobre sangramento, porém utilizando modelo diferente para sangramento e estimulação vagal<sup>21</sup>. Ainda que fosse demonstrada a alteração da estimulação prévia sobre a coagulação, os efeitos seriam de discutível aplicabilidade clínica, dada a imprevisibilidade do evento trauma. Pode-se especular, ainda, que a estimulação sobre o vago íntegro não é capaz de alterar a coagulação significativamente, já que fibras aferentes e eferentes são igualmente ativadas, sem direcionamento específico para regulação da resposta anti-inflamatória.

### 5.6 VAGO SECCIONADO: SECÇÃO BILATERAL DO NERVO VAGO, PRÉVIA AO CHOQUE HEMORRÁGICO

Não houve alterações significativas da coagulação após secção bilateral do nervo vago, previamente ao choque hemorrágico. Isto comprova que o nervo vago não atua de forma independente na regulação da coagulação. Foi demonstrado, anteriormente, que a vagotomia bilateral exacerba a resposta inflamatória, em ratos submetidos à ventilação mecânica, sem influência na coagulação<sup>16</sup>.

### 5.7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Estudos comparativos entre espécies demonstraram que os ratos são hipercoaguláveis<sup>36</sup>. Este fator pode ter aumentado o efeito pró-coagulante da estimulação vagal. Embora a hipotensão tenha sido significativa, não se produziu trauma tecidual significante com diferentes graus de hipoperfusão. Finalmente, não se utilizou hemoderivados durante a reposição volêmica, restringindo a aplicabilidade clínica do modelo.

## 6.CONCLUSÕES

O Estímulo do vago íntegro e do seu ramo aferente não altera a coagulação em ratos, quando analisados os parâmetros de tromboelastometria CT, ALFA, CFT e MCF. Por outro lado, o choque hemorrágico sucedido da reposição volêmica normotensiva reduz significativamente a força tênsil do coágulo em ratos. Finalmente, o estímulo eferente do nervo vago melhora a coagulação em ratos, quando considerados os parâmetros ALFA, CFT e MCF, após choque hemorrágico ao mesmo tempo em que reduzem a produção de IL-1 $\beta$  e aumentam a produção de IL-10, sinalizando uma provável modulação da resposta inflamatória pela via colinérgica.

### 6.1 PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de dispositivos implantáveis que atuam sobre o nervo vago já é uma realidade no que diz respeito ao tratamento das epilepsias; pode-se especular, assim, que se proponha o uso de dispositivos semelhantes com intuito de modular resposta inflamatória exacerbada e conseqüente coagulopatia associada ao trauma no segmento de pacientes vítimas de politraumatismo associado a sangramento grave. O uso de medicamentos que possam interagir com receptores colinérgicos, mimetizando moduladores da resposta inflamatória em nível dos macrófagos pode também ser apontado como uma especulação a ser considerada para aplicabilidade clínica do estímulo vagal pós choque hemorrágico no trauma. Por fim, com aprofundamento do conhecimento molecular, o bloqueio de precursores nucleares da resposta inflamatória como o NF $\kappa$ B, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e por conseguinte, minimizando os efeitos deletérios da inflamação sobre a coagulação.

## 7. REFERÊNCIAS

- 1- Rezende-Neto JB, Rizoli SB, Andrade MV, Ribeiro DD, Lisboa TA, Camargos ER, Martins P, Cunha Melo JR. Permissive hypotension and desmopressin enhance clot formation. *J Trauma* 2010; 68:42-51.
- 2- Hess RJ, Brohi K, Dutton RP, Hauser, CJ, Holcomb JB, Kluger Y, Mackway-Jones K, Parr MJ, Rizoli SB, Yukioka T, Bouillon B. The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. *J Trauma* 2008; 65:748-754.
- 3- Kheirabadi BS, Crissey JM, Deguzman R, Holcomb JB. In vivo bleeding time and in vitro thromboelastography measurements are better indicators of dilutional hypothermic coagulopathy than prothrombin time. *J Trauma*. 2007; 62:1352-1359.
- 4- Rugeri L, Levrat A, David JS. Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thromboelastography. *J Thromb Haemost*. 2007; 5:289-295.
- 5- Hoyt DB, Dutton RP, Hauser CJ. Management of coagulopathy in the patients with multiple injuries: results from an international survey of clinical practice. *J Trauma*. 2008; 65:755-765.7
- 6- Levi M, Van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*.2010; 38:26-34.
- 7- Tracey JK, Pavlov VA. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. *CMLS, Cellular and molecular life Sciences* 2004; 61:2322-2331.
- 8- Johnston GR, Webster NR. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *British Journal of Anaesthesia*. 2009;102(4):453-462
- 9- Borovikova VL, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000; 405:458-462.
- 10- Tracey JK. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Clin Invest*. 2007; 117:289-286.
- 11- Castoro AM, Yoo BP, Hincapie GJ, Hamann JJ, Ruble BS, Wolf DP, Grill MW. Excitation properties of the right cervical vagus nerve in adult dogs. *Exp Neurol*. 2011; 227:62-68.

- 
- 12- Bansal V, Ryu YS, Lopez N, Allexan S, Krzyzaniak, Eliceiri B, Baird A, Coimbra R. Vagal stimulation modulates inflammation through a ghrelin mediated mechanism in traumatic brain injury. *Inflammation*. 2012; 35:214-220.
- 13- Constantini TW, Bansal V, Peterson YC, Loomis HW, Putman GJ, Rankin F, Wolf P, Eliceiri PB, Baird A, Coimbra R. Efferent vagal nerve stimulation attenuates gut barrier injury after burn: Modulation of intestinal occluding expression. *J Trauma* 2010; 68:1349-1354.
- 14- Johansson IP, Sorensen AM, Perner A, Welling KL, Wanscher M, Larsen FC, Ostrowski RS. Disseminated intravascular coagulation or acute coagulopathy of trauma shock early after trauma. An observational study. *Critical Care* 2011; 15:2-10
- 15- Fries D, Innerhofer Petra, Schobersberger. Time for changing coagulation management in trauma-related massive bleeding. *Curr opin Anaesthesiol* 2009; 22:267-274
- 16- Van Cott E, Laposata M. Algorithms for Hypercoagulation Testing. *Laboratory medicine*. 2003; 34: 216-22.
- 17- Cohen MJ, Call M, Nelson M, Calfee CS, Esmon CT, Brohi K, Pittet JF. Critical role of activated protein C in early coagulopathy and later organ failure, infection and death in trauma patients. *Ann Surg* 2012; 255:379-385.
- 18- Dos Santos, CC, Shan Y, Akram A, Slutsky AS, Haistsma JJ. Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:471-482
- 19- Wohlaer, MV, Moore EE, Harr J, Gonzalez E, Fragoso M, Silliman C. A standardized technique for performing thromboelastography in rodents. *Shock* 2011; 36:524-526.
- 20- Franz, RC. ROTEM analysis: A significant advance in the field of rotational thromboelastography. *SAJS* 2009; 47:1-6.
- 21- Guarini S, et al. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor- $\kappa$ B activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation* 2003; 107:1189-1194.
- 22- Kox, M, Vaeneker M, Van der Hoeven JG, Scheffer G, Hoedemaekers CW, Pickkers P. Effects of vagus nerve stimulation and vagotomy on systemic and pulmonary inflammation in a two-hit model in rats. *PLoS ONE* 2012; 7:1-7
- 23- Czura JC, Schultz A, Kaipel M, Khadem A, Huston MJ, Pavlov AV, Redl H, Tracey JK. Vagus nerve stimulation regulates hemostasis in swine. *Shock* 2010; 33(6):608-613
- 24- Tracey JK, Pavlov AV. The Cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior and immunity* 2005; 19:493-499
- 25- Levy G, Fishman EJ, Da-zhong X, Dong W, Palange D, Vida G, Mohr A, Ulloa L, Deitch AE. Vagal nerve stimulation modulates gut injury and lung permeability in trauma-hemorrhagic shock. *J trauma acute care surg* 2012; 73(2):338-342

- 26-** Parr MJ, Bouillon B, Brohi K, Dutton RP, Hauser CJ, Hess JR, Holcomb JB, Kluger Y, Mackway-Jones K, Rizoli SB, Yukioka T, Hoyt, DB. Traumatic coagulopathy: where are the good experimental models? *The Journal of TRAUMA injury, infection, and critical care* 2008; 65:766-771
- 27-** Johansson PI, Stissing T, Bochsén L, Ostrowski SR. Thromboelastography and thromboelastometry in assessing coagulopathy in trauma. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. 2009; 17:1-8
- 28-** Allen GA, Wolberg AS, Oliver JA, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Impact of procoagulant concentration on rate, peak and total thrombin generation in a model system. *Journal Thromb Haemostat*. 2004; 2:402-413
- 26-** DeLong WG Jr, Born CT. Cytokines in patients with polytrauma. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 422:57-65
- 27-** Frith D, Groslings JC, Gaarder C, Maegele M, Cohen MJ, Allard S, Johansson PI, Stanworth S, Thiemermann C, Brohi K. Definition of drivers of acute traumatic coagulopathy: clinical experimental investigations. *J Thromb Haemost* 2010; 8:19-25
- 28-** Kutcher ME, Xu J, Vilard RF, Ho C, Esmon CT, Cohen MJ. Extracellular histone release in response to traumatic injury: implications for a compensatory role of activated protein C. *J Trauma Acute Care Surg* 2012; 73:1389-1394
- 29-** Hayashida K, Parks WC, Park PW. Syndecan-1 shedding facilitates the resolution of neutrophilic inflammation by removing sequestered CXC chemokines. *Blood* 2009; 114:3033-3043
- 30-** Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Müller W, Menon S, Davidson N, Gruning G, Rennick D. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest* 1995; 96:2339-2347
- 31-** Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res* 2001; 88:877-887
- 32-** Guarini S, Cainazzo MM, Giuliani D, Mioni C, Altavilla D, Marini H, Biagini A, Ghiaroni V, Passaniti M, Leone S, Bazzani C, Caputi AP, Squadrito F, Bertolini A. Adrenocorticotropin reverses hemorrhagic shock anesthetized rats through the rapid activation of a vagal inflammatory pathway. *Cardiovasc Res* 2004; 63:375-365

- 33-** Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M, Sunagawa K. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation* 2004; 109:120-124
- 34-** Pavlov VA, Tracey KJ. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:2322-2331
- 35-** Zhang Y, Popovic ZB, Bibevski S, Fakhry I, Sica DA, Van Wagoner DR, Mazghev TN. Chronic vagus nerve stimulation improves autonomic control and attenuates systemic inflammation and heart failure progression in a canine high-rate pacing model. *Circ Heart Fail* 2009; 2:692-699
- 36-** Matulla-Siller JM, Plasenzotti R, Spiel A, Quehenberger P, Jilma B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost* 2008; 100:397-404



## 8. ANEXOS

### 8.1 PROTOCOLO DE APROVAÇÃO NO CEUA

**UFMG****CERTIFICADO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Certificamos que o Protocolo nº. **052/2013**, relativo ao projeto intitulado “*Efeito do estímulo vagal sobre a coagulação em modelo de choque hemorrágico controlado*”, que tem como responsável **João Baptista de Rezende Neto** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 02/09/2013. Este certificado expira-se em 01/09/2018.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. **052/2013**, related to the Project entitled “*The role of vagal nerve stimulation on coagulopathy: experimental study on rats*”, under the supervision of **João Baptista de Rezende Neto**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/02/2013. This certificate expires in 09/01/2018.

Belo Horizonte, 03/09/2013.

  
Jacqueline Isaura Alvarez Leite  
Coordenadora da CEUA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha- Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3409-4516 –

Fax: (31) 3409-4592

[www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua)

- [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## 8.2 CARTA PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGO

May 1, 2014

Dr. Fredrick Moore, MD  
Editor in Chief World Journal of Emergency Surgery  
Chief of Acute Care Surgery

Dear Dr. Moore,

We are hereby submitting the manuscript entitled **“Vagus nerve stimulation improves coagulopathy in hemorrhagic shock: a thromboelastometric animal model study”** to be considered for publication in the **WORLD JOURNAL OF EMERGENCY SURGERY**.

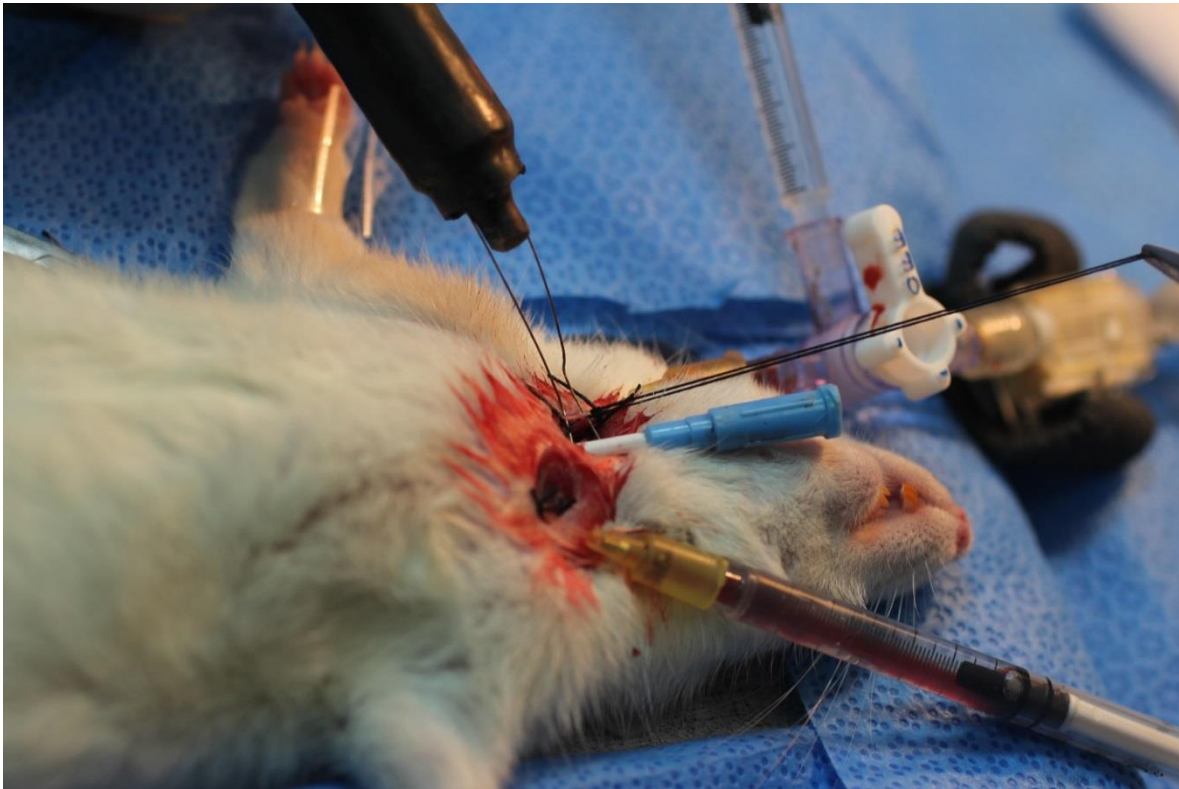
This manuscript has been submitted solely to the **WORLD JOURNAL OF EMERGENCY SURGERY**. The authors have no conflicts of interest to declare.

This study was approved by the Animal Research and Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, and conducted under stringent animal ethics protocol.

Sincerely,

Joao B. Rezende-Neto, MD, PhD, FACS  
Associate Professor of Surgery, University of Toronto  
Trauma and Acute Care Surgery, St Michael’s Hospital

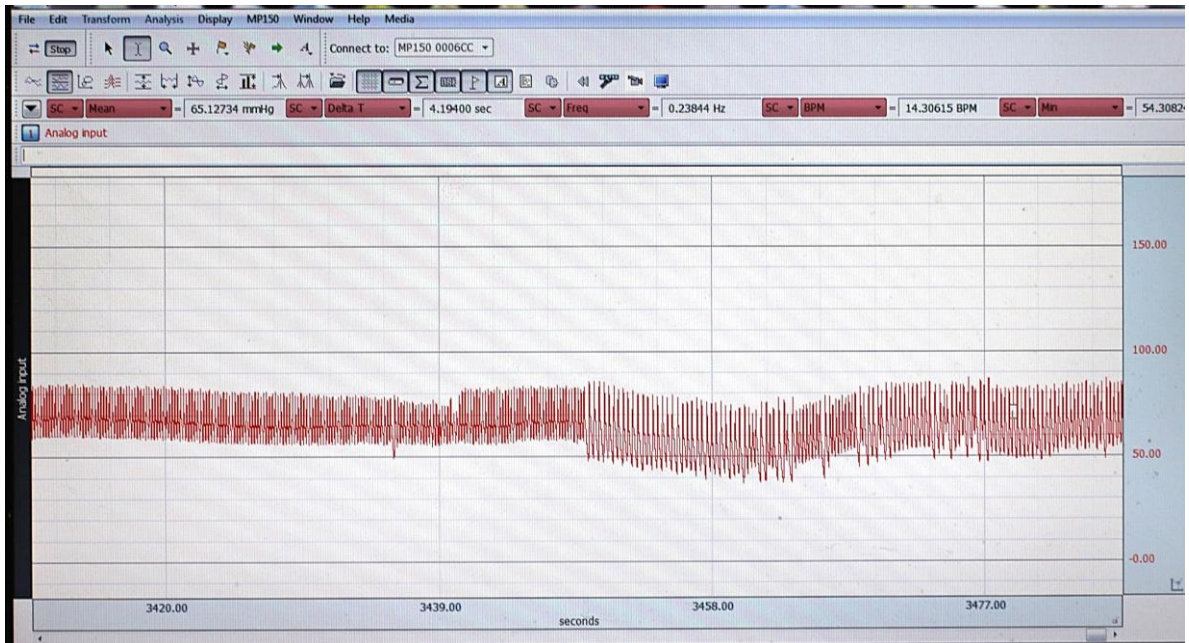
### 8.3 FOTOS DO EXPERIMENTO



Rato wistar macho sendo submetido ao estímulo vagal



Estimulador elétrico utilizado no experimento



Momento do estímulo vagal registrado na monitorização de PIA, marcado pela redução na frequência de pulso e aumento na amplitude.