

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

**UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DO USO DE
ATORVASTATINA EM PACIENTES COM SEPSE GRAVE OU
CHOQUE SÉPTICO: EFEITOS NA FUNÇÃO ENDOTELIAL**

TESE DE DOUTORADO
KAREN FONTOURA PRADO

Professora orientadora:
Dra. Nadine Clausell

Porto Alegre, dezembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DO USO DE
ATORVASTATINA EM PACIENTES COM SEPSE GRAVE OU
CHOQUE SÉPTICO: EFEITOS NA FUNÇÃO ENDOTELIAL

KAREN FONTOURA PRADO

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde: Cardiologia e Ciências
Cardiovasculares para obtenção do título
de Doutor em Ciências Cardiovasculares.

Professora Orientadora:

Dra. Nadine Clausell

Porto Alegre, dezembro de 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e _____ em 18/12/2013, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Léa Fialkow

Prof. Dr. Emílio Moriguchi

Dr. Cassiano Teixeira

Fontoura Prado, Karen

Um ensaio clínico randomizado do uso de atorvastatina em pacientes com sepse grave ou choque séptico: efeito sobre a função endotelial / Karen Fontoura Prado. -- 2013.
85 f.

Orientadora: Nadine Clausell.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. sepse. 2. endotélio. 3. estatinas. I. Clausell, Nadine, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Para minha filha Mariana

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da UFRGS, empenhado em qualificar a universidade para a comunidade formando mestres, doutores e pesquisadores, agradeço a estrutura que possibilitou a realização deste doutorado.

À equipe do Serviço de Terapia Intensiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte durante a fase de coleta de dados e pelas contribuições na fase de elaboração do projeto.

À equipe do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a bióloga Daiane Silvello pelo auxílio na execução do trabalho de bancada e dosagem dos biomarcadores.

Ao então acadêmico, hoje médico formado, Roberto Vanin Pinto Ribeiro, pela valiosa colaboração na execução do projeto e na elaboração dos manuscritos e apresentações.

Ao cardiologista e pesquisador Leandro Quintana Becker pelo auxílio na concepção do projeto de pesquisa e pela competente e dedicada execução dos exames de ultrassom e ao professor Dr. Luis Eduardo Paim Rohde que nos orientou e deu suporte em todos os aspectos relacionados ao tema.

À Dra. e amiga Cyntia Aguiar Ribeiro que percorreu comigo todo este caminho dividindo conquistas e frustrações, buscando soluções e oferecendo incentivo para continuar e concluir a jornada.

Em especial, á Dra. Nadine Clausell, minha orientadora neste doutorado e no mestrado, que confiou e acreditou na minha capacidade para realizar estes projetos. Obrigada por me incentivar, pela generosidade em partilhar tempo e conhecimento, pelas intervenções precisas, por ser exemplo de profissional ética e dedicada.

Á minha filha Mariana cuja existência me desafia a superar meus limites e a encontrar o melhor em mim.

Ao meu esposo Mario Luis por aceitar minhas escolhas, pela cumplicidade e por tentar fazer sempre tudo mais fácil para mim.

Esta tese de doutorado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Doenças Cardiovasculares da UFRGS, sendo apresentada na forma de revisão da literatura e um manuscrito sobre o tema da tese:

1. Revisão da literatura.

2. Artigo original referente ao trabalho de pesquisa propriamente dito que deverá ser submetido para publicação em periódico científico de circulação internacional conforme normas do mesmo.

SUMÁRIO

I. REVISÃO DA LITERATURA

INTRODUÇÃO.....	13
SEPSE E ENDOTÉLIO.....	16
Ativação e disfunção endotelial na sepse.....	16
Alteração das propriedades adesivas do endotélio na sepse.....	19
Alteração do relaxamento vascular dependente do endotélio.....	20
Papel das citocinas na ativação e disfunção endotelial.....	24
ESTATINAS E ENDOTÉLIO.....	25
Efeitos das estatinas além da redução de lipídios.....	25
Estatinas e disfunção endotelial.....	26
Estatinas e inflamação.....	29
ESTATINAS E SEPSE.....	30
CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS.....	37
RACIONAL DO ESTUDO.....	51
HIPÓTESE.....	52
OBJETIVOS.....	52

II. ARTIGO ORIGINAL.....	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUCTION.....	56
METHODS.....	58
RESULTS.....	63
DISCUSSION.....	75
STUDY LIMITATIONS.....	80
CONCLUSIONS.....	80
REFERENCES.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil coenzima A redutase

PAF: Fator de ativação plaquetário

ELAM: Molécula da adesão leucocitária

ICAM: Molécula de adesão intercelular

sVCAM: Molécula solúvel de adesão da célula vascular

ON ou NO: Óxido nítrico

ET: Endotelina 1

ONS ou NOS: Óxido nítrico sintetase

cONS ou cNOS: Óxido nítrico sintetase constitutiva

iONS ou iNOS: Óxido nítrico sintetase induzida

VMF ou FMD: Vasodilatação mediada por fluxo

IL: Interleucina

TNF: Fator de necrose tumoral α

PCR: Proteína C reativa

CK: Creatinina cinase

FMO: Falência de múltiplos órgãos

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

Figura 1: Patofisiologia da sepse e falência de múltiplos órgãos.....18

Figura 2. Alteração das propriedades adesivas do endotélio na sepse.....20

Figura 3: Mecanismo de ação das estatinas.....27

Artigo original

Figure 1: Screening, enrollment, and randomization of the study patients.....64

Figure 2: Temporal variation of FMD.....69

Figure 3: Profile of biomarkers of endothelial dysfunction.....71

LISTA DE TABELAS

Artigo original

Table 1: Baseline characteristics of the patient population.....	66
Table 2: Serum lipid and lipoproteins levels in the statin and placebo groups at baseline and after 72 hours.....	67
Table 3: Secondary outcomes.....	73
Table 4: Safety profile of treatment group.....	74

REVISÃO DA LITERATURA

SEPSE, ESTATINAS E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

INTRODUÇÃO

Sepse é uma condição letal e cada vez mais frequente entre pacientes hospitalizados tornando-se um desafio da prática médica principalmente devido às limitadas opções terapêuticas disponíveis. Apesar dos avanços na medicina de cuidados intensivos, da disponibilidade de um largo espectro de agentes antimicrobianos e da incorporação de tecnologias para monitorização e diagnóstico, a mortalidade desta condição permanece elevada variando de 15% na sepse grave a 60% nos casos de choque séptico (1-5). Neste sentido, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que alterem favoravelmente este prognóstico é uma meta a ser alcançada.

Atualmente a síndrome séptica é entendida como um delicado balanço entre mecanismos de defesa do organismo acionados por microrganismos invasores e os efeitos diretos e indiretos exercidos por estes microrganismos e seus produtos (6). O resultado da complexa interação entre estes eventos pró e anti-inflamatórios é conhecido como síndrome de resposta inflamatória sistêmica (7). Os mecanismos desencadeados durante este processo incluem a liberação de citocinas, ativação de monócitos e neutrófilos, ativação do sistema de complemento e das vias intrínseca e extrínseca da coagulação e do sistema fibrinolítico, bem como produção e liberação de óxido nítrico (ON) entre outros (8, 9). A ativação e liberação destes mediadores ocorre nos tecidos e na circulação sendo estes territórios delimitados pelas células endoteliais que participam ativamente deste processo. Estas células são capazes de adaptar suas funções em resposta a interação com mediadores inflamatórios produzidos por outras células bem como de gerarem elas mesmas um

grande número de mediadores que irão atuar em outras células e tecidos amplificando a resposta do organismo. Presumivelmente o endotélio desempenhe um papel fundamental na patogênese da sepse, não somente por sua interação com a cascata inflamatória, mas também porque na sepse a função endotelial pode ser alterada de forma a induzir suas complicações (10, 11). Desta forma, o restabelecimento ou a modulação da função endotelial é um potencial alvo para terapias direcionadas a modificarem o prognóstico da sepse.

Estatinas ou inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase são drogas largamente utilizadas como redutores de lipídios séricos devido a sua capacidade de bloquear a conversão hepática de HMG-CoA para L-mevalonato, um passo fundamental para a síntese de colesterol (12-14). A redução de lipídios séricos pelas estatinas tem sido associada em diversos estudos com redução de risco de eventos coronarianos e cerebrovasculares, bem como, com o aumento das taxas de sobrevivência de pacientes com doença arterial coronariana (15-17). No entanto, o colesterol é apenas um dos muitos produtos do mevalonato. Esta molécula é precursora de diversos compostos isoprenóides necessários para o trânsito intra celular de proteínas, para proliferação celular e outras importantes funções celulares (18, 19). Na última década tem sido demonstrado que as estatinas possuem efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores que são independentes da redução de lipídios séricos, muitos dos quais mediados pelo bloqueio da HMG-CoA redutase e envolvendo uma interação com o endotélio vascular (20-22). Estatinas diminuem a tendência pró inflamatória de leucócitos e monócitos, reduzem a liberação de citocinas e reagentes de fase aguda, impedem a expressão de moléculas de adesão, limitam a ativação das células endoteliais e melhoram a função endotelial pela redução da relação entre as enzimas óxido

nítrico sintetase induzível (iONS) e óxido nítrico sintetase endotelial constitutiva (cONS) (23, 24). Este potencial anti-inflamatório e imunomodulador das estatinas tem despertado grande interesse na investigação do papel destes agentes no tratamento da sepse (25, 26).

Este artigo pretende revisar os aspectos da interação entre sepse, endotélio e estatinas que sustentam o possível benefício destes agentes como terapia adjuvante no tratamento da sepse.

SEPSE E ENDOTÉLIO

O corpo humano contém aproximadamente 10^{13} células endoteliais, pesando cerca de um quilograma e cobrindo uma superfície de 4000 m^2 a 7000 m^2 (27). Entre outras funções as células endoteliais mediam o tono vasomotor e a vaso permeabilidade, previnem a coagulação, regulam o tráfico de elementos entre a circulação e os tecidos, contribuem para o equilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios, participam da geração de novos vasos sanguíneos e da morte celular programada (6, 8, 11) . Cada uma destas funções é regulada de forma diferente no tempo e no espaço sendo este fenômeno conhecido como heterogeneidade das células endoteliais ou diversidade vascular.

Ativação e disfunção endotelial na sepse

A sepse induz modulação fenotípica do endotélio por uma variedade de mecanismos. A agressão da célula endotelial causada por patógenos e a ação de componentes da parede bacteriana como os lipopolissacarídeos, ativam um padrão de reconhecimento que desencadeia alterações na função endotelial essenciais para que o organismo defenda-se da agressão. Além disso, fatores derivados da resposta do organismo à infecção tais como complemento, citocinas, fibrina, leucócitos e plaquetas ativados, hiperglicemia e espécies reativas de oxigênio também interagem com o endotélio modificando sua função. Esta alteração da função endotelial é conhecida como ativação do endotélio e ocorre não apenas na sepse, mas em toda situação que envolva inflamação e alterações biomecânicas da parede vascular tais como cisalhamento por fluxo turbilhonado e aumento da pressão hidrostática (6, 28). Embora a ativação do endotélio seja necessária para a

manutenção do equilíbrio do organismo frente a uma agressão, a ativação excessiva, sustentada e generalizada que ocorre na sepse grave representa um estado de disfunção endotelial e está associada com falência de múltiplos órgãos (FMO) e morte (11). A transição do padrão de ativação do endotélio para lesão endotelial varia de acordo com a natureza do patógeno, com a genética do hospedeiro, sua idade, sexo, co-morbidades e com a localização do leito vascular exposto. Neste cenário e, dependendo da intensidade e duração do estímulo, as células endoteliais podem sofrer alterações estruturais e funcionais passando a contribuir para a manutenção e progressão da sepse (28). A alteração nas propriedades adesivas do endotélio, do tônus vasomotor dependente do endotélio e a produção de citocinas estão entre as principais modificações da função endotelial induzidas pela sepse e estão associadas com o prognóstico desta doença (Figura 1).

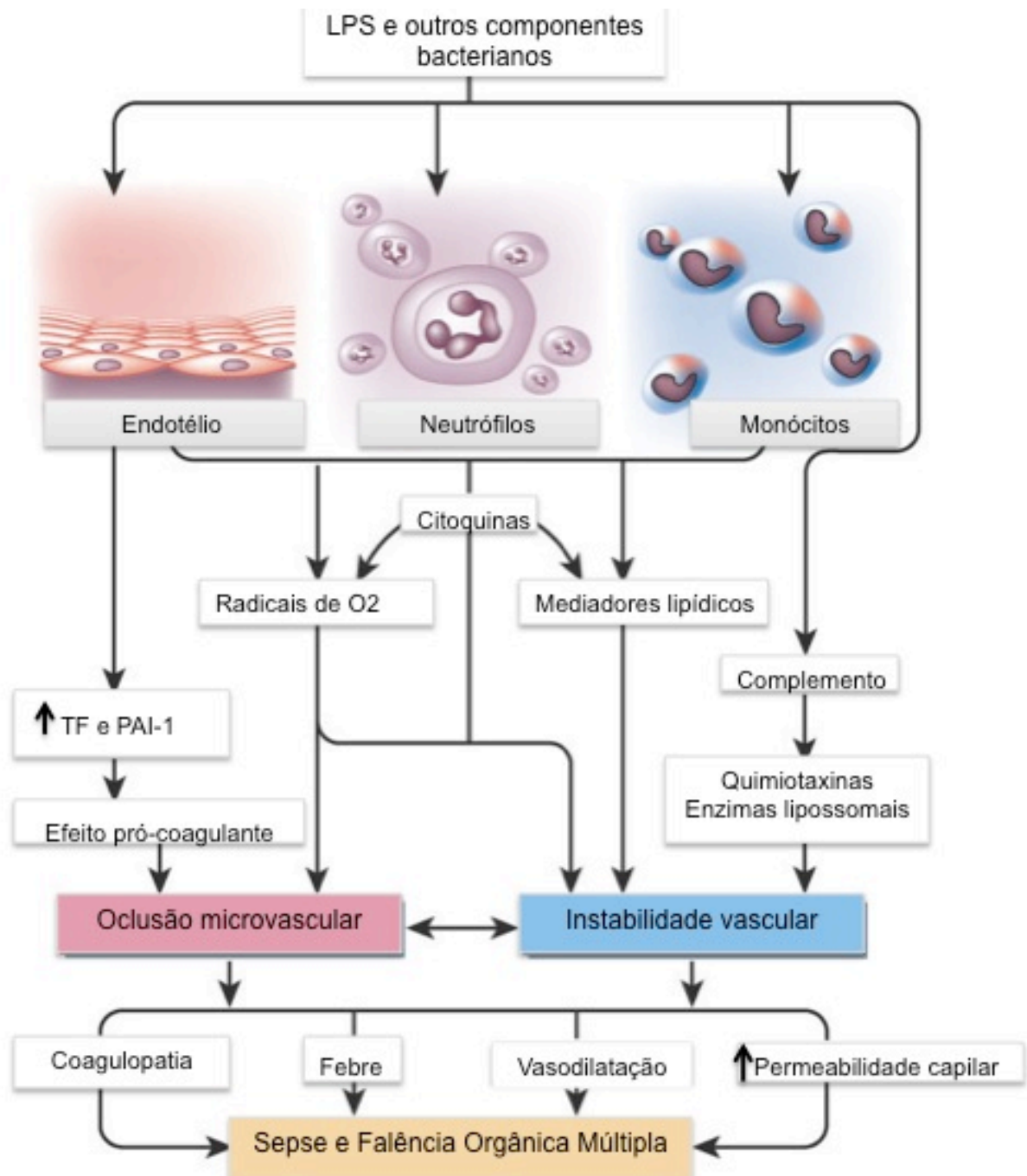


Figura 1. Patofisiologia da sepse e falência de múltiplos órgãos. Adaptado de Gao, F. e colaboradores (29).

Alteração das propriedades adesivas do endotélio na sepse

Antecedendo sua migração para os tecidos onde irão participar da cascata inflamatória, monócitos e leucócitos devem aderir ao endotélio. Tanto a adesão como a migração destas células através da barreira endotelial são controladas pela interação complementar entre moléculas de adesão expressas nos polimorfonucleares circulantes e nas células endoteliais (30). A modulação da expressão destas moléculas e sua afinidade adesiva são altamente reguladas por mediadores biológicos como as citocinas [interleucina (IL)-8, IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferon gama] e o fator de ativação plaquetário (31) (Figura 2). As moléculas expressas no endotélio em resposta aos estímulos gerados pela sepse são a molécula endotelial de adesão leucocitária [(ELAM)-1 ou E-selectina], a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e a molécula de adesão da célula vascular (VCAM)-1. A E-selectina é um mediador precoce da adesão entre leucócitos e endotélio em estados inflamatórios, enquanto a ICAM-1 e a VCAM-1 mediam a firme adesão entre estas células e a sua diapedese através da barreira endotelial (31). Anticorpos monoclonais direcionados a estas moléculas bloqueiam a interação entre leucócitos e células endoteliais e atenuam a disfunção orgânica associada à sepse em modelos animais (32). A associação entre gravidade da sepse, desenvolvimento de FMO e elevação dos níveis séricos das moléculas de adesão tem sido observada em diversos estudos sugerindo que estas moléculas possam ser utilizadas como marcadores biológicos deste processo (33, 34). Kayal e colaboradores encontraram níveis circulantes significativamente elevados de E-selectina e de ICAM-1 solúveis em pacientes sépticos, estando estes níveis correlacionados à gravidade da doença e ao número de falências orgânicas desenvolvidas (35). Em pacientes adultos sépticos o nível elevado de VCAM-1 foi

identificado como preditor independente do desenvolvimento de FMO e, em crianças, as elevações simultâneas da ICAM-1 e da VCAM-1 também correlacionam-se com esta falência (36).

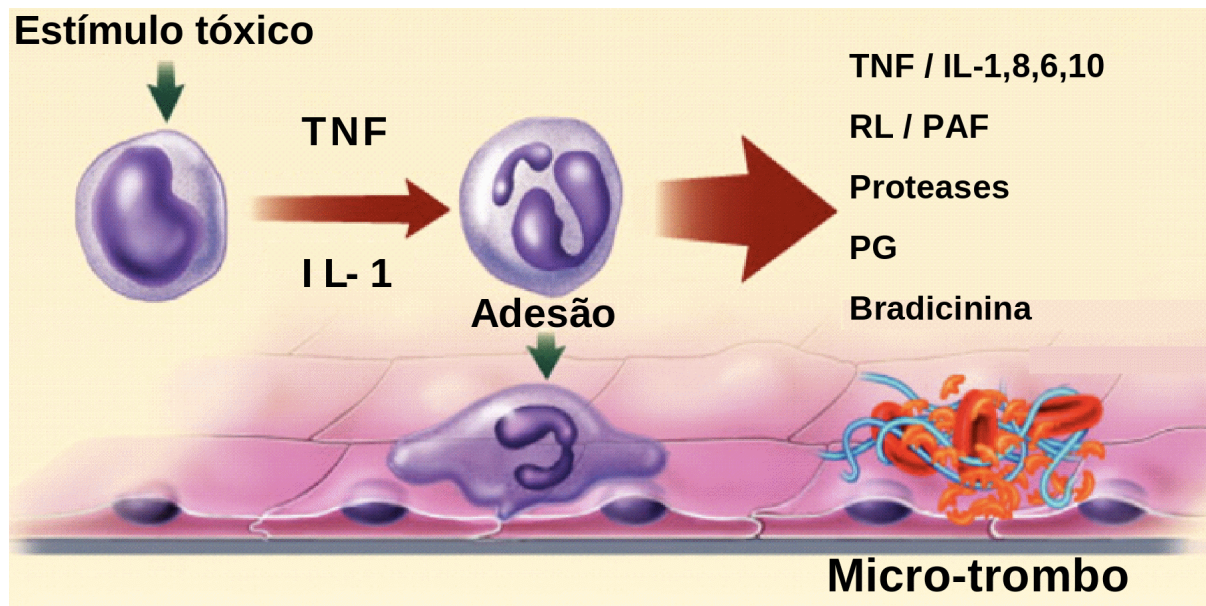


Figura 2. Alteração das propriedades adesivas do endotélio na sepse. Adaptado de Weeler, AP e colaboradores (37).

Alteração do relaxamento vascular dependente do endotélio

O tônus vasomotor é regulado pela combinação de mecanismos dependentes e independentes do endotélio. A regulação dependente do endotélio envolve a produção e degradação continuada de compostos vasoativos que regulam a pressão sanguínea nos diferentes territórios vasculares. Estes compostos são agentes vasodilatadores, representados principalmente pelo óxido nítrico ON, bem como vasoconstritores como a endotelina (ET)-1 (11, 38). Durante ativação do endotélio e sob a influencia de mediadores inflamatórios a produção destes agentes é profundamente modificada.

O ON é produzido por diversas células do organismo a partir da L-arginina com participação da enzima óxido nítrico sintetase (ONS). Em condições fisiológicas as células endoteliais expressam uma isoforma desta enzima, a cONS, que produz continuamente pequenas quantidades de ON responsável por diversas funções endoteliais (39, 40). Nestas condições o ON derivado do endotélio mantém a perfusão da microcirculação por vasodilatação que se opõe a vasoconstrição mediada quimicamente e através do sistema simpático que poderia afetar adversamente a perfusão tecidual. Além da regulação do tônus vasomotor existem evidências sugerindo que o ON gerado pela cONS também protege a integridade do endotélio através de ações anti-inflamatórias, da modulação da expressão genética, da prevenção da apoptose das células endoteliais induzida por estresse, da inibição da agregação e ativação plaquetária e da redução da adesão de leucócitos à superfície endotelial (41).

Durante a sepse fatores como citocinas pró-inflamatórias circulantes, endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo estimulam a expressão da isoforma iONS da ONS nas células endoteliais. A iNOS é responsável pela produção sustentada de grande quantidade de ON independente do conteúdo de cálcio iônico intracelular. Esta exagerada produção de ON está implicada na profunda vasodilatação observada nos pacientes sépticos e na hiporresponsividade que estes pacientes apresentam aos agentes vasoconstritores (38, 42). Da mesma forma, a geração patológica de ON também contribui significativamente para a disfunção miocárdica presente na sepse e choque séptico (43, 44). Por outro lado, o estado funcional da cONS na sepse e endotoxemia ainda não está plenamente elucidado. Estudos experimentais tem demonstrado uma diminuição na atividade da cONS que resulta em impedimento do relaxamento vascular dependente do endotélio nestas situações

(45). Possivelmente este achado seja consequência de um encurtamento da meia vida do cONS mRNA ou a alteração na mobilização de cálcio induzida por hipóxia ou citocinas (46, 47).

A avaliação da função vasomotora dependente do endotélio e mediada por ON é um método útil para estimar a integridade funcional do endotélio *in vivo*. Este aspecto da função endotelial é mais comumente avaliado através da resposta vasomotora a estímulos farmacológicos como acetilcolina, metacolina, bradicinina, serotonina e fluxo turbilhonado. No entanto, a medida da dilatação da artéria braquial mediada por fluxo (VMF) e dependente do endotélio através de ultrassom de alta resolução propicia uma forma não invasiva de avaliar a função endotelial do leito vascular periférico (48). Esta técnica utiliza o aumento do cisalhamento hemodinâmico provocado durante hiperemia reativa como um estímulo para liberação de ON e indução de vasodilatação da artéria braquial e tem sido empregada em diversos cenários clínicos.

A anormalidade do relaxamento vascular dependente do endotélio na sepse tem sido descrita em estudos *in vitro* e em modelos experimentais animais (45, 49), bem como em alguns estudos em humanos. Bhagat e colaboradores demonstraram que em voluntários saudáveis mesmo uma breve exposição à endotoxina ou a algumas citocinas produz impedimento do relaxamento dependente do endotélio por muitos dias (50). Similarmente, Nevière e colaboradores observaram que mesmo na presença de níveis normais ou elevados de oferta de oxigênio, a VMF secundária a hiperemia reativa é atenuada em pacientes com choque séptico (51). Esta alteração da VMF também foi descrita por Vaudo e colaboradores precedendo a evolução para FMO quando identificada precocemente em pacientes sépticos (52). Recentemente, um estudo conduzido por Becker e colaboradores demonstrou

que alterações na VMF são precoces na sepse e que o declínio progressivo desta função está associado com pior prognóstico (53). Com base nestas informações é possível supor que a VMF possa ser utilizada para avaliar a função endotelial na sepse, bem como o efeito de intervenções direcionadas para restaurar esta função e a perfusão tecidual.

No outro extremo da alteração da função reguladora do tônus vasomotor dependente do endotélio produzida pela sepse está a ET-1. Este peptídeo é um potente vasoconstritor constitutivamente secretado pelas células endoteliais que participa ativamente da regulação do tônus vascular (54). A liberação de ET-1 pelo endotélio é estimulada, entre outros, por hipóxia tecidual, endotoxinas, TNF- α , IL-1, trombina e angiotensina-2. A inibição da produção deste peptídeo ocorre em resposta a prostracilinas, ON, peptídeo atrial natriurético e heparina (55). O envolvimento da ET-1 na fisiopatologia da sepse é sugerido pelos seus elevados níveis plasmáticos nesta condição (56). Além deste fato, a infusão de ET-1 em humanos reproduz alterações semelhantes às observadas na sepse como diminuição do débito cardíaco e vasoconstrição pulmonar, renal e esplâncnica (55). Outras ações da ET-1 que podem estar envolvidas na sepse são a ativação de neutrófilos aumentando a expressão de moléculas de adesão na superfície destas células promovendo sua ligação ao endotélio e a produção de espécies reativas de oxigênio (57, 58).

A relação entre níveis elevados de ET-1 com pior prognóstico em pacientes com choque séptico foi demonstrada em estudo de Takakuwa e colaboradores (59). Da mesma forma, Brauner e colaboradores identificaram valores significativamente elevados de ET-1 nas primeiras seis horas de evolução de pacientes que morreram por choque séptico quando comparados a sobreviventes (60). Em conjunto, estes

dados sugerem que a monitorização precoce dos níveis séricos de ET-1 em pacientes com choque séptico possa contribuir para identificar pacientes de pior prognóstico.

Papel das citocinas na ativação e disfunção endotelial

Conforme tem sido demonstrado em diversos modelos experimentais a reação inflamatória na sepse é orquestrada por uma cascata de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6 e TNF- α e anti-inflamatórias como a IL-10 (61). A ação destes agentes é fundamental para que o organismo possa combater e controlar a agressão imposta pelo agente invasor. No entanto, esta resposta do organismo pode ser caracterizada por uma excessiva reação pró-inflamatória que resulta em níveis circulantes elevados destes mediadores potencializando a ativação e a lesão endotelial e contribuindo para a falência orgânica (62). A detecção de níveis circulantes elevados destas citocinas em pacientes com choque séptico tem sido apontada como útil na avaliação da gravidade e do prognóstico desta condição (63). Dentre estas citocinas pro-inflamatórias, a IL-6 tem uma meia vida mais prolongada que o TNF- α e a IL-1 β e seus níveis são consistentemente elevados na presença de inflamação e infecção (64). Por exemplo, a medida dos níveis séricos da IL-6 tem sido descrita como preditora de gravidade e prognóstico em pacientes com choque séptico, trauma, pancreatite grave e choque cardiogênico (65-67). Hack e colaboradores estudando pacientes com sepse encontraram uma associação positiva entre os níveis elevados desta molécula e a presença de choque com hiperlactatemia, bem como com mortalidade (68). Estes autores sugerem que a principal origem desta citocina na sepse seja a produção pelas células endoteliais lesadas. Portanto, a IL-6 pode ser um marcador

de disfunção endotelial na sepse. Corroborando esta hipótese, Oda e colaboradores evidenciaram que a medida sequencial da IL-6 está progressivamente mais elevada em pacientes sépticos não sobreviventes quando comparados a sobreviventes estando os níveis elevados associados ao desenvolvimento de FMO (69).

ESTATINAS E ENDOTÉLIO

Efeitos das estatinas além da redução de lipídios

As estatinas são drogas que atuam principalmente como inibidoras da HMG-CoA redutase, uma enzima cuja concentração é um passo limitante para formação de colesterol no fígado e outros tecidos. Através da inibição da HMG-CoA redutase, as estatinas reduzem o conteúdo de colesterol nos hepatócitos, estimulam a expressão de receptores LDL e promovem a remoção de LDL-C da circulação (70). Este efeito das estatinas tem sido largamente explorado no âmbito das doenças cardiovasculares. Importantes estudos multicêntricos avaliaram as estatinas na prevenção primária ou secundária de doença arterial coronariana (DAC) (71-74). As evidências destes estudos são inequívocas em demonstrar a eficácia e a segurança das estatinas em reduzir morbidade e mortalidade em pacientes com e sem manifestações clínicas de DAC. Embora este efeito benéfico tenha sido inicialmente atribuído exclusivamente a redução dos níveis de LDL colesterol, estudos posteriores mostraram um benefício destes agentes além do esperado em relação à esta redução (20). No estudo WOSCOPS – West of Scotland Coronary Prevention Study (75) – os pacientes recebendo pravastatina obtiveram um maior benefício do que o predito pelo modelo de risco de Framingham: enquanto a predição de redução

de risco foi de 24%, a redução observada com o uso da pravastatina foi de 35%. Estudos subsequentes têm sugerido que este efeito adicional das estatinas está relacionado a propriedades anti-inflamatórias destes agentes. No estudo CARE (Cholesterol and Recurrent Events) a redução de risco relativo para eventos coronarianos produzida pela pravastatina, foi duas vezes maior nos pacientes com elevação de marcadores plasmáticos de inflamação (76). Além deste fato, pravastatina reduziu os níveis séricos destes marcadores nos pacientes tratados. No estudo PRINCE (Pravastatin Inflammation/CPR Evaluation) a pravastatina reduziu em 15% os níveis séricos de proteína C reativa (PCR) sem nenhuma correlação entre esta redução e qualquer nível de lipoproteínas examinado (77). Da mesma forma, em pacientes receptores de transplante cardíaco e renal, a pravastatina reduziu a incidência de episódios agudos de rejeição, bem como o desenvolvimento de vasculopatia associada ao transplante (78). Em conjunto estas observações sugerem que as estatinas apresentem além da sua ação na redução de lipídeos uma ação anti-inflamatória e imunomoduladora. Grande parte destas ações são exercidas através da interação das estatinas com o endotélio vascular.

Estatinas e disfunção endotelial

Ao inibir a HMG-CoA redutase as estatinas não apenas reduzem a produção de colesterol mas também inibem a síntese de outras importantes moléculas isoprenóides tais como farnesilpirofosfato (FPP) e geranigeranilpirofosfato (GGPP) (Figura 3).

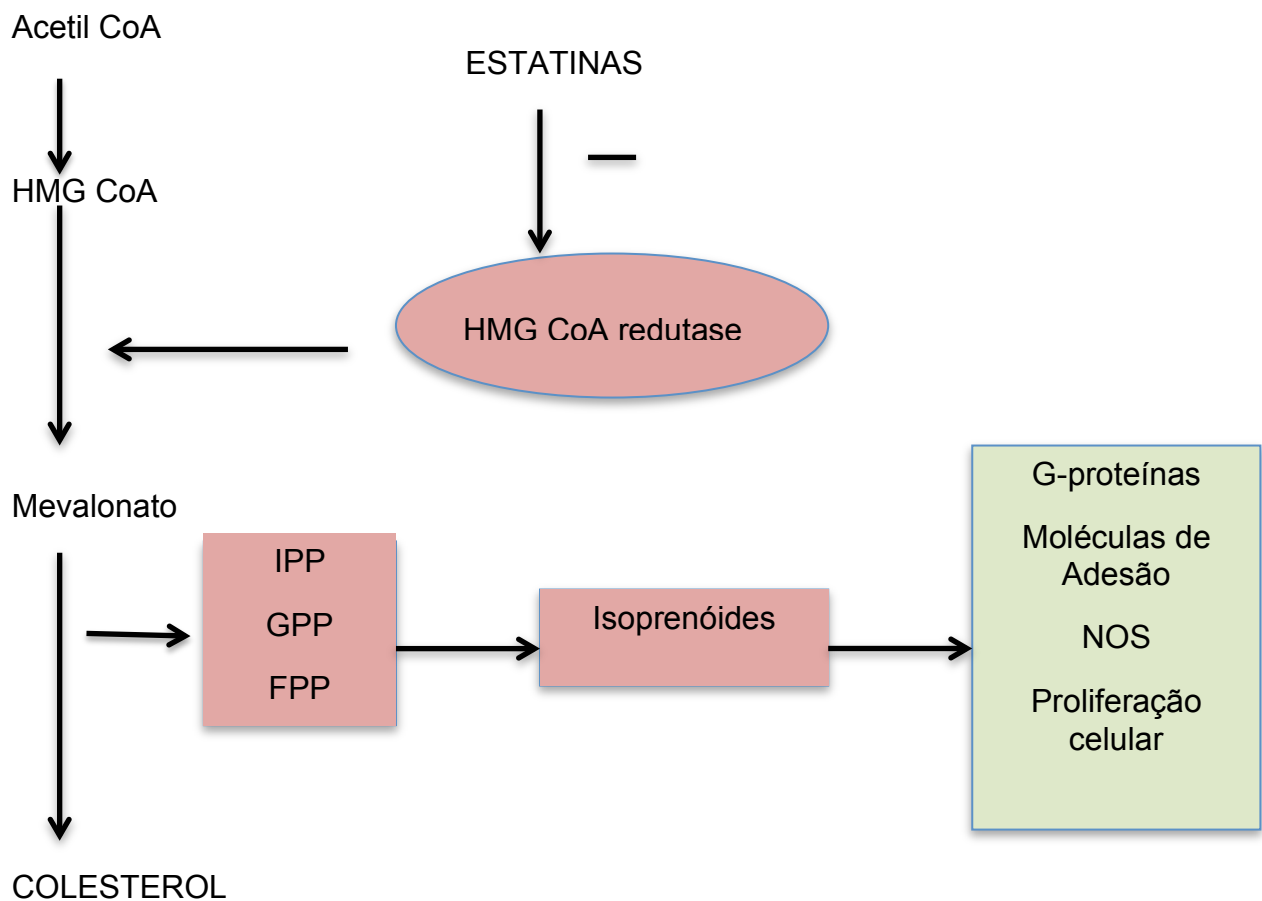


Figura 3. Mecanismo de ação das estatinas. 3-HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-co-enzima A; FFP: farnesilpirofosfato; GGPP: geranilgeranilpirofosfato; IPP: isopentasilpirofosfato; NOS: óxido nítrico sintetase. Adaptado de Chalmers JD e col. (79).

Estas moléculas são necessárias para a modificação pós-translacional (frenilação) de uma grande variedade de proteínas, incluindo as pequenas GTP-ligantes Ras e Rho (19, 80). A inibição da frenilação de Ras e Rho impede a ativação destas proteínas interferindo com suas ações sobre a motilidade, a forma, a proliferação e a secreção celulares. Por outro lado, ao bloquear a rota metabólica do mevalonato, as estatinas também promovem a ativação da proteína quinase AKT

que é outra importante mediadora de processos da célula endotelial como a apoptose (80). Além disso, as estatinas podem atuar diretamente sobre as células endoteliais diminuindo a expressão e a produção de citocinas inflamatórias (22, 81).

Uma importante característica da disfunção endotelial é o impedimento da síntese, liberação e atividade do ON derivado do endotélio. Estatinas atuam no endotélio aumentando a biodisponibilidade de ON através de mecanismos relacionados à redução de LDL-colesterol ou por ação direta envolvendo o aumento da atividade da cONS (ativação da Akt, inibição da frenilação de proteínas, redução do caveolin-1) (24). Este aumento da biodisponibilidade do ON induzido pelas estatinas é provavelmente um dos mecanismos associados à recuperação da VMF produzida por estes agentes em situações clínicas nas quais esta disfunção está presente. Em ensaios clínicos com pacientes hipercolesterolêmicos a redução dos níveis de colesterol induzido por estatinas está associado a aumento da biodisponibilidade de ON e melhora da VMF (82). Jonh e colaboradores evidenciaram que após apenas duas semanas de tratamento, a cerivastatina produziu redução do colesterol e recuperação da disfunção endotelial com aumento da biodisponibilidade de ON em pacientes com discreta hipercolesterolemia (83). No entanto, alguns estudos têm demonstrado que este efeito benéfico das estatinas sobre a função endotelial também pode ser observado independentemente da redução de lipídios. Em estudo com culturas de células endoteliais, a pravastatina aumentou a produção de ON por mecanismo independente da redução de lipídios e provavelmente associado à ativação da cONS (84). Em pacientes idosos e diabéticos, Tsunekawa e colaboradores demonstraram uma significativa recuperação da VMF com apenas três dias de uso de cerivastatina e sem redução

do lipídios séricos. Os autores sugerem que este efeito possa ser em parte devido ao aumento da expressão da cONS induzido pela cerivastatina (85). Em homens normoclesterolemicos com função vascular normal, tratamento com altas doses de atorvastatina (80 mg) aumentou o fluxo de sangue do antebraço após 24 horas de administração, enquanto o colesterol sérico e a PCR reduziram após dois dias. Neste estudo a interrupção da estatina em 30 dias resultou em rápido retorno do fluxo do antebraço aos níveis basais, enquanto a PCR e o colesterol elevaram-se lentamente (86). Também em pacientes com doença coronariana estável uma dose de atorvastatina foi capaz de melhorar a VMF coronariana avaliada após 24 horas sem alteração significativa do colesterol (87).

Estatinas e inflamação

Um dos primeiros passos na formação da resposta inflamatória é a adesão de monócitos e linfócitos T ao endotélio com sua posterior migração para os tecidos subendoteliais. A secreção local de citocinas pró-inflamatórias, quimioquinas e fator de crescimento pelos macrófagos e linfócitos T ativados promove recrutamento crescente de células inflamatórias amplificando e perpetuando este processo. Em estudos *in vitro* tem sido documentada a capacidade das estatinas de diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8) e de quimioquinas (MCP-1) por macrófagos ativados (88-90). Em coelhos hipercolesterolêmicos a atorvastatina reduziu significativamente a concentração de IL-6 circulante após duas semanas de tratamento (91). A redução da produção de IL-6 pode estar relacionada à redução da produção da PCR observada em pacientes em tratamento com estatinas, uma vez que a IL-6 é o principal indutor da síntese hepática desta proteína (92). Em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica o uso prévio de

atorvastatina reduziu significativamente a liberação de IL-6 e IL-8, bem como a adesão de neutrófilos ao endotélio no período pós operatório imediato, sugerindo uma atenuação da cascata inflamatória produzida por estes medicamentos (93). A influência das estatinas sobre as propriedades adesivas do endotélio também tem sido explorada em outros estudos que demonstram que estas drogas inibem a expressão de moléculas de adesão tais como CD11 e LFA-1 nos leucócitos e ICAM-1, P-selectina, VCAM-1 e CD40 nas células endoteliais (94, 95). Novamente, em pacientes com hipercolesterolemia tratados com atorvastatina houve uma redução significativa e precoce dos níveis da molécula de ICAM-1 solúvel inversamente correlacionada com a VMF refletindo desta forma uma melhora da função endotelial nestes pacientes (96).

ESTATINAS E SEPSE

As propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, imunomodulatórias, antiapoptóticas, antiproliferativas, antitrombóticas e de proteção do endotélio atribuídas às estatinas tem levado a um grande interesse em explorar o potencial uso destes agentes no tratamento da sepse.

Em um modelo experimental de sepse polimicrobiana por ligadura e perfuração do ceco em ratos, Merx e colaboradores demonstraram que o tratamento prévio com sinvastatina melhorou significativamente a sobrevida dos animais tratados (97). Utilizando o mesmo modelo em um ensaio clínico randomizado e controlado por placebo com administração de diferentes estatinas após indução da sepse, estes autores também demonstraram um significativo aumento da sobrevida dos animais tratados com sinvastatina (37 ± 3.6 horas), pravastatina (39 ± 3.9 horas) e atorvastatina (40 ± 4.2 horas) em relação aos animais que receberam placebo

(23±1.2 horas) (98). O aumento da sobrevida observado foi baseado na preservação da função cardíaca e hemodinâmica dos animais tratados. A melhora da suscetibilidade ao estímulo da ONS e a redução da adesão de leucócitos ao endotélio nos animais que receberam estatinas foi sugerido como parte do mecanismo de ação destes compostos. Mais recentemente Beffa e colaboradores também demonstraram que em ratos com lesão por queimadura, o tratamento com sinvastatina iniciado antes da indução de sepse por ligadura e perfuração de ceco, reduziu a mortalidade (99). Neste modelo os níveis séricos de IL-6 foram igualmente elevados nos animais sépticos tratados e não tratados com sinvastatina sugerindo que o efeito benéfico observado não seria explicado por interferência sobre este mediador inflamatório.

Em humanos alguns estudos observacionais tem sugerido um efeito benéfico das estatinas em pacientes com risco aumentado de ou que desenvolvem infecção. Liappis e colaboradores avaliaram retrospectivamente 388 episódios de infecção com bacteremia e encontraram uma redução significativa de mortalidade absoluta e atribuída entre os pacientes que estavam fazendo uso de estatinas em relação aos pacientes que não usavam esta medicação (100). Da mesma forma, Kruger e colaboradores também demonstraram uma redução na mortalidade hospitalar por todas as causas (10.6% vs. 18.3%, $p=0.022$) e na mortalidade atribuída a bacteremia (6.1% vs. 18.3%, $p=0.014$) em pacientes que estavam recebendo tratamento com estatina no momento da bacteremia (101). Em um estudo semelhante, porém prospectivo, Almong e colaboradores, avaliaram 361 pacientes, 82 dos quais usando estatina por mais de 30 dias antes de admissão hospitalar, e concluíram que o uso prévio desta medicação foi associado a redução da taxa de sepse grave e admissão na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (102). Os autores

atribuem este achado a um efeito protetor das estatinas provavelmente relacionado a seus efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios. No entanto, este possível efeito das estatinas na função endotelial não foi diretamente avaliado. Em um grande estudo observacional baseado em um registro prospectivo de episódios de bacteremia na população da Dinamarca, Thomsen e colaboradores detectaram uma substancial redução da mortalidade entre 31 e 180 dias após episódio de bacteremia entre os pacientes usando estatinas (103). No entanto, a mortalidade no curto prazo não foi alterada nestes pacientes. Em outra coorte populacional, Hackman e colaboradores demonstraram uma significativa redução na incidência de sepse entre os pacientes recebendo estatina (104). Este efeito protetor atribuído às estatinas foi mantido mesmo em subgrupos de alto risco para desenvolvimento de sepse como diabetes melito e insuficiência renal crônica. Similarmente, Frost e colaboradores em um estudo retrospectivo e observacional examinaram o efeito do tratamento com estatinas na mortalidade por influenza ou doença pulmonar obstrutiva crônica (105). Os autores concluíram que o tratamento com moderada dose de estatina foi protetor para morte por pneumonia com uma razão de chances de 0,49 (95% CI 0.26-0.76). Em um estudo de corte usando escores de propensão, Douglas e colaboradores também demonstraram que comparados com indivíduos que não estavam usando estatinas o risco de morrer em um período de seis meses após um episódio de pneumonia foi substancialmente menor entre indivíduos usando estatina por um período prolongado antes do episódio (106). Em contraste, Majumdar e colaboradores também avaliando pacientes com pneumonia não encontraram associação entre o uso de estatinas e redução da mortalidade ou da necessidade de admissão em UTI nestes pacientes. Estes autores sugerem que o benefício atribuído ao uso de estatinas em estudos prévios possa ser resultado de

fatores de confusão comuns em estudos observacionais e retrospectivos (107). Da mesma forma, Yendes e colaboradores não encontraram evidência de efeito protetor do uso de estatinas em desfechos clínicos em pacientes com pneumonia adquirida na comunidade (108). Porém, uma modesta diferença no nível sérico de marcadores biológicos de inflamação foi observado (TNF- α , IL-6, IL-10). Embora algumas revisões sistemáticas e metanálises direcionadas para avaliar o papel das estatinas na prevenção ou no tratamento de infecções sugiram que estatinas possam ser benéficas nesta situação (109-112), uma metanálise recente conduzida por Van den Hoek e colaboradores não corrobora estes achados (113). Neste estudo foram incluídos apenas ensaios clínicos randomizados com estatinas como tratamento e placebo como controlador. Embora em nenhum dos estudos incluídos na análise o efeito das estatinas sobre a infecção ou sobre a função endotelial fosse um desfecho primário, as taxas de ocorrência de infecção foram relatadas. Nesta metanálise o uso de estatina não foi associado com redução do risco de infecção (risco relativo 1.00, 95% intervalo de confiança 0.96 a 1.05; $p=0.93$) nem com redução do risco de mortalidade relacionada a infecção (0.97, 0.83 a 1.13; $p=0.71$). Os autores atribuem esta diferença em relação às metanálises anteriores ao fato de que naquelas terem sido incluídos principalmente estudos observacionais. Recentemente alguns ensaios clínicos randomizados têm explorado diretamente o efeito de estatinas sobre o processo infeccioso.

Novack e colaboradores avaliaram a hipótese de estatinas reduzirem a incidência de sepse grave e os níveis de citocinas inflamatórias em pacientes com infecção bacteriana em um ensaio clínico randomizado duplo cego e controlado por placebo (114). O estudo foi interrompido prematuramente devido à baixa taxa de inclusão de pacientes. Embora os níveis de IL-6 e TNF- α tenham diminuído

significativamente após 72 horas nos pacientes que receberam sinvastatina, não houve diferença significativa destes valores quando comparados ao grupo placebo. Também não foi observada menor progressão para sepse grave entre os pacientes tratados. Da mesma forma, em outro ensaio clínico randomizado e controlado por placebo, Kruger e colaboradores examinaram a taxa da progressão para sepse ou atenuação da resposta inflamatória em pacientes com infecção que vinham em tratamento destas drogas antes da admissão hospitalar. Os autores demonstraram que a continuação do tratamento com estatinas não foi associada com atenuação da resposta inflamatória ou falência orgânica. Por outro lado, a interrupção do tratamento também não foi associada com rebote inflamatório ou piora da disfunção orgânica (115). Já Patel e colaboradores conduziram um ensaio clínico randomizado administrando atorvastatina ou placebo para pacientes com infecção aguda durante sua internação hospitalar e verificaram uma redução da taxa de conversão para sepse grave entre os pacientes tratados (4% vs. 24%; $p=0.007$) (116). Em um estudo mais recente, também conduzido por Kruger e colaboradores, a administração de atorvastatina para pacientes com sepse grave com ou sem uso prévio de estatina não mostrou diferença nos níveis séricos de IL-6 (desfecho primário), no tempo de internação ou na mortalidade na unidade de terapia intensiva, no escore de gravidade SOFA, na mortalidade hospitalar, na mortalidade em 28 e 90 dias (desfechos secundários) quando comparado a placebo (117). Interessantemente, entre os pacientes que vinham utilizando estatina antes do quadro séptico as concentrações basais de IL-6 foram significativamente menores e a administração de atorvastatina a esta coorte foi associada com melhora na sobrevivência em 28 dias quando comparada a placebo (5% e 28% respectivamente; $p=0.01$). Esta diferença não se sustentou em 90 dias. Ainda, Novack e

colaboradores avaliando pacientes com baixos níveis basais de LDL-colesterol e elevados níveis basais de PCR randomizados para receber rosuvastatina ou placebo, observaram uma modesta redução na incidência de pneumonia entre os pacientes tratados com estatina sem diferença nos níveis de PCR (118). No entanto, Papazian e colaboradores em um ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado por placebo, multicêntrico em pacientes com suspeita de pneumonia associada a ventilação mecânica, não encontraram diferença na mortalidade em 21 dias e o estudo foi prematuramente interrompido após a primeira análise interina por futilidade (119). Os autores concluem que os achados não suportam o uso de estatinas com o objetivo de melhorar prognóstico em pneumonia associada à ventilação mecânica.

Embora dados experimentais e observacionais, bem como algumas metanálises baseadas nestas informações, sugiram um efeito protetor das estatinas em relação à infecção, o papel destes agentes no tratamento da sepse e o seu efeito na disfunção endotelial associada a sepse tem sido avaliados em poucos estudos prospectivos e randomizados com resultados ainda inconclusivos.

CONCLUSÃO

Na última década tem havido um crescente interesse no uso das estatinas para prevenção e/ou tratamento de infecções. Este interesse baseia-se no conhecimento de que estatinas apresentam efeitos de proteção e melhora da função endotelial que podem influenciar favoravelmente o curso de infecções. Grande parte das informações disponíveis suportam um possível efeito benéfico das estatinas neste contexto. No entanto, estas informações são principalmente originadas em estudos experimentais e observacionais passíveis de abrigarem erros de seleção e

fatores de confusão que comprometem a interpretação dos resultados. Desta forma, até o presente momento, não existem evidências suficientemente fortes que sustentem o uso de rotina de estatinas em pacientes sépticos, sendo necessário um maior número de ensaios clínicos direcionados a esclarecer os diversos aspectos envolvidos na interação entre estatinas, infecção e disfunção endotelial.

REFERÊNCIAS

1. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 2007;33:606-18.
2. Angus DC, Wax R. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med.* 2001;29(Suppl):S109-S16.
3. Silva E, Pedro MA, Sogayar AB, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES). *Crit Care.* 2004;8(R251-R260).
4. Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre M, et al. CurreCUB-REA Network. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:165-72.
5. Vincent J, Sakr Y, Sprung C, et al. Sepsis in european intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006;34:344-53.
6. Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med.* 2001;29(7(suppl)):S21-S7.
7. Levy MM, Fink MP, Marshall J, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003;29:530-8.
8. Jagneaux T, Taylor DE, P.Kantrow S. Coagulation in sepsis. *Am J Med Sci.* 2004;328(4):196-204.
9. Dellinger RP. Inflammation and coagulation: Implications for the septic patient. *Clin Infect Dis.* 2003;36:(10)1259-65.
10. Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med.* 2001;29(Suppl):S99-S106.
11. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003;101(10):3765-77.

- 12.** Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res.* 1992;33:1569-82.
- 13.** Knopp RH. Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med.* 1999;341(7):498-508.
- 14.** Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J.* 2002;144:S27-32.
- 15.** Pyorala K, Pedersen TR, Kjekshus J, et al. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care.* 1997;20(4):614-20.
- 16.** Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2003;361:1149-58.
- 17.** Topol EJ. Intensive statin therapy: a sea change in cardiovascular prevention. *N Engl J Med.* 2004;350(15):1562-4.
- 18.** Massy ZA, Keane WF, Kassiske BL. Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? *Lancet.* 1996;347:102-3.
- 19.** Liao Jk. Isoprenoides as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest.* 2002;110(3):285-8.
- 20.** Marz, WK. HMG-CoA reductase inhibition: anti-inflammatory effects beyond lipid lowering? *J Cardiovasc Risk.* 2003;10:169-79.
- 21.** Halcox JPJ, Deanfield JE. Beyond the Laboratory - Clinical implications for statin pleiotropy. *Circulation.* 2004;109(suppl II):42-8.

22. Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A. The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther.* 2003;99(1):95-112.
23. Terblanche M, Almog Y, Rosenson RS, Smith TS, Hackam DG. Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(5):358-68.
24. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation.* 2004;109 (suppl III):III-39-III-43.
25. Adamson P, Greenwood J. How do statins control neuroinflammation? *Inflamm res.* 2003;52:399-403.
26. Mach F. Statins as immunomodulatory agents. *Circulation.* 2004;109[suppl II]:II-15-II-7.
27. Gross P, AIRD W. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26:463-78.
28. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med.* 2007;35:2408-16.
29. Gao F, Linhartova L, Johnston AM, et al. Statins and sepsis. *Br J Anaesth.* 2008;100(3):288-98.
30. Springer T. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Ann Rev Physiol.* 1995;57:827-72.
31. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, et al. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30(5(suppl)):S302-S12.
32. Gardinali M, Borrelli E, Chiara O, et al. Inhibition of CD11b/CD18 complex prevents acute lung injury and reduces mortality after peritonitis in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1022-9.

- 33.** Cowley H, Heney D, Gearing A, et al. Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study. *Crit Care Med.* 1994;22(4):651-7.
- 34.** Sessler C, Windsor A, Schwartz M. Circulating ICAM-1 is increased in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151:1420-1427. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:1420-7.
- 35.** Kayal S, Jais J, Aguni N, et al. Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule , and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:776-84.
- 36.** Whalen M, Doughty L, Carlos T, et al. Intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are increased in the plasma of children with sepsis-induced multiple organ failure. *Crit Care Med.* 2000;28:2600-7.
- 37.** Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med.* 1999;34:207.
- 38.** Vincent J-L, Zhang H, Szabo C, et al. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1782-5.
- 39.** Palmer R, Ferrige A, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-6.
- 40.** Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2003;1:2112-8.
- 41.** Ignarro L. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res.* 1989;65:1-21.
- 42.** Nduka O, Parrilo J. The pathophysiology of septic shock. *Crit Care Clin.* 2009;25:677-702.

43. Kumar A, Krieger A, Symeonides S, et al. Myocardial dysfunction in septic shock: Part II. Role of cytokines and nitric oxide. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2001;15(4):485-511.
44. Court O, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A. Clinical review: myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care.* 2002;6:500-8.
45. Wang P, Ba Z, Chaudry I. Endothelium-dependent relaxation is depressed at the macro and microcirculatory levels during sepsis. *AM J Physiol.* 1995;269:R988-R94.
46. Liao J, Zulueta J, Yu F, et al. Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen. *J Clin Invest.* 1995;96:2661-6.
47. Graier W, Myers P, Rubin L, et al. Escherichia coli endotoxin inhibits agonist-mediated cytosolic Ca²⁺ mobilization and nitric oxide biosynthesis in cultured endothelial cells. *Circ Res.* 1994;75:659-68.
48. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 2002;90(suppl):40L-8L.
49. Lecierc J, Pu Q, et al. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessels dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med.* 2000;28:3672-8.
50. Bhagat K, Collier J, Vallance P. Local venous responses to endotoxin in humans. *Circulation.* 1996;94:490-7.
51. Nevière R, Mathieu D, Chagnon J, et al. Skeletal muscle microvascular blood flow and oxygen transport in patients with severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:191-5.
52. Vaudo G, Marchesi S, Siepi D, et al. Human endothelial impairment in sepsis. *Atherosclerosis.* 2008;197(2):747-52.

- 53.** Becker L, Prado K, Foppa M, et al. Endothelial dysfunction assessed by brachial artery ultrasound in severe sepsis and septic shock. *J Crit Care.* 2012;27(3):316.e9-14.
- 54.** Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411-5.
- 55.** Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, et al. The endothelin system in septic and endotoxin shock *Eur J Pharmacol.* 2000;407:1-15.
- 56.** Battistini B, Forget A, Laight D. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relation to cytokines. *Shock.* 1996;5:167-83.
- 57.** Ishizuka T, Takamizawa M, Suzuki K, et al. Endothelin-1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor alfa-stimulated vascular endothelial cells. *Eur j Pharmacol.* 1999;369:237-45.
- 58.** Cheng T, Shih N, Chen S, et al. Reactive oxygen species modulate endothelin-I-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 1999;41:654-62.
- 59.** Takakuwa T, Endo S, Nakae H, et al. Plasma levels of TNF-alpha, endothelin-1 and thrombomodulin in patients with sepsis. *Res Commum Chem Pathol Pharmacol.* 1994;84:261-9.
- 60.** Brauner JS, Rohde L, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor- α : early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2000;26(3):305-13.

61. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.* 2000;28(4(suppl)):N3-N12.
62. Gustot T. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory responses. *Curr Opin Crit Care.* 2011;17(2):153-9.
63. Presterl E, Staudinger T, Pettermann M, et al. Cytokine profile and correlation to the APACHE III and MPM II scores in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:825-32.
64. Panacek E, Kaul M. IL-6 as a marker of excessive TNF-alfa activity in sepsis. *Sepsis.* 1999;3:65-73.
65. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, et al. Is interleukin-6 an early marker of severity following major trauma in humans? *Arch Surg.* 2000;135:291-5.
66. Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, et al. Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit Care Med.* 2005;33:89-97.
67. Remick DG, Bolgos G, Copeland S, et al. Role of Interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. *Infect Immun.* 2005;73(5):2751-7.
68. Hack E, De Groot E, Felt-Bersma R, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood.* 1989;74:1704-10.
69. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, et al. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine.* 2005;29:169-75.
70. Vaughan CJ, Gotto AM. Update on statins: 2003. *Circulation.* 2004;110:886-92.

71. Downs J, Clearefield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. JAMA. 1998;279:1615-22.
72. The Scandinavian Simvastatin Survival Study Group: randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Study (4S). Lancet. 1994;344:1383-9.
73. Shepherd J, Cobbe S, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. N Engl J Med. 1995;333:1301-7.
74. Serruys P, de Feyter P, Macaya C, et al. Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. JAMA. 2002;287:3215-22.
75. WOSCOPS Group: Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study. Circulation 1998;97:1440-5.
76. Ridker P, Rifai N, Pfeffer M, et al. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. Circulation. 1998;98:839-44.
77. Albert M, Danielson E, Rifai N, et al. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels. JAMA. 2001;286:64-70.
78. Kobashigawa J, Katznelson S, Laks H, et al. Effect of pravastatin on outcomes after transplantation. N Engl J Med. 1995;333:621-7.

- 79.** Chalmers JD, Short PM, Mandal P, et al. Statins in community acquired pneumonia: Evidence from experimental and clinical studies. *Respir Med.* 2010;104(8):1081-91.
- 80.** Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:729-36.
- 81.** Kwak B, Mulhaupt F, Mach F. Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. *Autoimmun Rev.* 2003;2:332-8.
- 82.** Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003;58:719-31.
- 83.** John S, Delles C, Jacobi J, et al. Rapid improvement of nitric oxide bioavailability after lipid-lowering therapy with cerivastatin within two weeks. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:1351-8.
- 84.** Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, et al. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:234-41.
- 85.** Tsunekawa T, Hayashi T, Kano H, et al. Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl Coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function in elderly diabetic patients within 3 days. *Circulation.* 2001;104:376-9.
- 86.** Laufs U, Wassmann S, Hilger S, et al. Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. *Am J Cardiol.* 2001;88:1306-7.
- 87.** Wassmann S, Faul A, Hennen B, et al. Rapid effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition on coronary endothelial function. *Circ Res.* 2003;93:98-103.

88. Chen H, Ikeda U, Shimpo M, et al. Direct effects of statins on cells primarily involved in atherosclerosis. *Hypertens Res.* 2000;23:187-92.
89. Ikeda U, Shimada K. Statins and monocytes. *Lancet.* 1999;353:2070.
90. Zelvyte I, Dominaitiene R, Crisby M, et al. Modulation of inflammatory mediators and ppar alfa and nfkb expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes in vitro. *Pharmacol Res.* 2002;45:147-54.
91. Zhao SP, Zhang DQ. Atorvastatin reduces interleukin-6 plasma concentration and adipocyte secretion of hypercholesterolemic rabbits. *Clin Chim Acta.* 2003;336(1-2):103-8.
92. Munford R. Statins and the acute-phase response. *N Engl J Med.* 2001;344(26):2016-8.
93. Chello M, Patti G, Candura D, et al. Effects of atorvastatin on systemic inflammatory response after coronary bypass surgery. *Crit Care Med J.* 2006;34(3):660-7.
94. Weitz-Schmidt G, Weizenbach K, Brinkmann V, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nature.* 2001;7(6):687-91.
95. Stalker T, Lefer A, Scalia R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rouvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *Br J Pharmacol.* 2001;133:406-12.
96. Nawawi H, Osman NS, Annuar R, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 levels reflect endothelial dysfunction in patients with primary hypercholesterolaemia treated with atorvastatin. *Atherosclerosis.* 2003;169:283-91.

- 97.** Merx MW, Liehn EA, Janssens U, et al. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis. *Circulation*. 2004;109(21):2560-5.
- 98.** Merx M, Liehn EA, Graf J, et al. Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation*. 2005;112:117-24.
- 99.** Beffa DC, Fischman AJ, Fagan SP, et al. Simvastatin treatment improves survival in a murine model of burn sepsis: Role of interleukin 6. *Burns*. 2011;37(2):222-6.
- 100.** Liappis AP, Kan VL, Rochester CG, et al. The effect of statins on mortality in patients with bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1352-7.
- 101.** Kruger P, Fitzsimmons K, Cook D, et al. Statin therapy is associated with fewer deaths in patients with bacteremia. *Intensive Care Med*. 2006;32(75-79).
- 102.** Almong Y, Shefer A, Novack V, et al. Prior statin therapy is associated with a decreased rate on severe sepsis. *Circulation*. 2004;110:880-5.
- 103.** Thomsen RW, Hundborg HH, Johnsen SP, et al. Statin use and mortality within 180 days after bacteremia: A population-based cohort study. *Crit Care Med*. 2006;34(4):1080-6.
- 104.** Hackam DG, Mamdani M, Li P, et al. Statins and sepsis in patients with cardiovascular disease: a population-based cohort analysis. *Lancet*. 2006;367(9508):413-8.
- 105.** Frost FJ, Petersen H, Tollestrup K, et al. Influenza and COPD mortality protection as pleiotropic, dose-dependent effects of statins. *Chest*. 2007;131:1006-12.
- 106.** Douglas I, Evans S, Smeeth L. Effect of statin treatment on short term mortality after pneumonia episode: cohort study. *BMJ*. 2011;342:d1642.

- 107.** Majumdar SR, McAlister FA, Eurich DT, et al. Statins and outcomes in patients admitted to hospital with community acquired pneumonia: population based prospective cohort study. *BMJ*. 2006;333:999.
- 108.** Yende S, Milbrandt EB, Kellum JA, et al. Understanding the potential role of statins in pneumonia and sepsis. *Crit Care Med*. 2011;39(8):1871-8.
- 109.** Falagas ME, Makris GC, Matthaïou DK, et al. Statins for infection and sepsis: a systematic review of the clinical evidence. *J Antimicrob Chemoth*. 2008;61(4):774-85.
- 110.** Tleyjeh IM, Kashour T, Hakim FA, et al. Statins for the prevention and treatment of infections: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2009;169(18):1658-67.
- 111.** Björkhem-Bergman L, Bergman P, Andersson J, et al. Statin treatment and mortality in bacterial infections – a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2010;5(5):102-107.
- 112.** Janda S, Young A, FitzGerald JM, et al. The effect of statins on mortality from severe infections and sepsis: a systematic review and meta-analysis. *J Crit Care*. 2010;25(4):7-22.
- 113.** Van den Hoek HL, Bos WJ, de Boer A, et al. Statins and prevention of infections: systematic review and meta-analysis of data from large randomised placebo controlled trials. *BMJ*. 2011;343:d7281.
- 114.** Novack V, Eisinger M, Frenkel A, et al. The effects of statin therapy on inflammatory cytokines in patients with bacterial infections: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Intensive Care Med*. 2009;35(7):1255-60.

- 115.** Kruger PS, Harward ML, Jones MA, et al. Continuation of statin therapy in patients with presumed infection: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(6):774-81.
- 116.** Patel JM, Snaith C, Thickett DR, et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of 40 mg/day of atorvastatin in reducing the severity of sepsis in ward patients (ASEPSIS Trial). *Crit Care.* 2012;16(6):R231.
- 117.** Kruger P, Bailey M, Bellomo R, et al. A multicenter randomized trial of atorvastatin therapy in intensive care patients with severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(7):743-50.
- 118.** Novack V, MacFadyen J, Malhotra A, et al. The effect of rosuvastatin on incident pneumonia: results from the JUPITER trial. *CMAJ.* 2012;184(17):367-72.
- 119.** Papazian L, Roch A, Charles P, Penot-Ragon C, Perrin G, Roulier P, et al. Effect of statin therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2013;310(16):1692-700.

RACIONAL DO ESTUDO

Sepse grave e choque séptico são eventos comuns e frequentemente fatais. Apesar dos avanços no tratamento desta doença a mortalidade e morbidade associadas permanecem elevadas justificando a necessidade da busca de novas opções terapêuticas que possam modificar este cenário.

O endotélio vascular é um dos principais órgãos envolvidos na fisiopatologia da sepse. Embora a ativação do endotélio seja um passo fundamental na defesa do organismo no combate a infecção, a disfunção endotelial está associada a um pior prognóstico e a evolução para falência orgânica múltipla nesta condição. Neste sentido, estratégias direcionadas ao restabelecimento da função endotelial podem ser benéficas no manejo da sepse.

Estatinas ou inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, são drogas largamente utilizadas na prática médica como redutoras de colesterol estando associadas à redução de mortalidade e morbidade em pacientes com risco cardiovascular aumentado. No entanto, diversos estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que as estatinas possuem efeitos benéficos não dependentes da redução de lipídios. Grande parte destes efeitos é exercida através da interação das estatinas com o endotélio vascular.

Recentemente estudos experimentais e observacionais têm sugerido um potencial efeito benéfico das estatinas na sepse. É possível supor que estes efeitos possam ser mediados pela atenuação da disfunção endotelial presente na sepse. De fato, embora seja reconhecida a ação benéfica exercida pelas estatinas sobre a função endotelial em diversas condições clínicas, o papel destes agentes na disfunção endotelial da sepse ainda não foi suficiente e adequadamente esclarecido.

HIPÓTESE

Estatinas (inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase), podem atuar como estabilizadores da membrana celular modulando favoravelmente a resposta inflamatória e a função endotelial na sepse.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Em um ensaio clínico randomizado comparando atorvastatina e placebo, avaliar a função endotelial e níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios em pacientes com sepse grave e choque séptico.

Objetivos específicos

1. Avaliar a resposta funcional do endotélio através VMF e mensurada por ultrassonografia de alta resolução da artéria braquial, usando como estímulo a hiperemia reacional, comparando pacientes com sepse grave ou choque séptico recebendo atorvastatina ou placebo.

2. Determinar o nível plasmático de sVCAM-1, IL-6 e ET-1 em pacientes com sepse grave ou choque séptico recebendo atorvastatina ou placebo.

ARTIGO ORIGINAL

**A CLINICAL RANDOMIZED TRIAL ON THE USE OF ATORVASTATIN IN
PATIENTS WITH SEVERE SEPSIS OR SEPTIC SHOCK: EFFECTS ON
ENDOTHELIAL FUNCTION**

Abstract

Background: Endothelial dysfunction and inflammation are key players in the pathogenesis of sepsis. Statins have pronounced immunomodulatory effects, independent of lipid lowering. These effects of statins appear to involve the restoration or improvement of endothelial function by increasing the bioavailability of nitric oxide (NO), reducing oxidative stress and inhibiting inflammatory responses.

Objective: We hypothesized that statins can improve endothelial dysfunction in septic patients.

Methods: A double-blind, placebo-controlled trial was undertaken, with adult patients within 24 hours of severe sepsis or septic shock diagnosis randomized to receive treatment with placebo or atorvastatin 80 mg/day. Endothelial dysfunction was assessed using flow-mediated dilatation (FMD) of the brachial artery and by measuring plasma levels of soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM)-1, interleukin (IL)-6 and endothelin (ET)-1 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at baseline and 24 and 72 hours after randomization.

Results: We studied 47 patients (mean age 52 ± 20 ; 29.1% males; APACHE II risk score 23.5 ± 7.3): 24 in the placebo group and 23 in the statin group. No significant difference was observed in the temporal variation of FMD between groups. Similarly, no significant differences were observed in the temporal variation of biomarker levels between the treatment and the control groups, except for changes observed in sVCAM-1 levels. The hospital mortality rate was similar in both groups.

Conclusions: Our data showed no benefit for the acute use of a potent statin in patients with severe sepsis or septic shock regarding improvement in endothelial function parameters.

Clinical trial registration number: NCT00452608.

Keywords: sepsis; endothelial function; statins; infection.

Introduction

Severe sepsis is common, with a prevalence of approximately 2.3 cases per 100 hospital discharges in the USA. This prevalence translates into an annual burden of approximately 836,000 cases, 68% of which require intensive care unit (ICU) treatment (1). The frequency of sepsis in European ICUs is also high, with > 35% of patients having sepsis at some point during their ICU stay (2). Severe sepsis is frequently fatal, with hospital mortality rates between 20% and 50% (3). Thus, an important goal in critical care medicine is to develop novel therapeutic strategies that will favorably affect patient outcomes in sepsis.

The pathophysiology of severe sepsis involves a highly complex, integrated response that includes activation of different cell types, synthesis of inflammatory mediators and changes in the hemostatic system. Endothelial activation is central to these processes and appears to be highly dependent on changes in nitric oxide (NO) balance, involving decreased eNOS activity and increased, unbalanced iNOS activity (4). These characteristics make the endothelium a target for therapeutic interventions that aim to improve the prognosis of sepsis (5-7).

Statins are lipid-lowering drugs featuring multiple pleiotropic anti-inflammatory/immunomodulatory effects that are independent of their lipid-lowering effect (8, 9). Indeed, many of the pleiotropic vascular effects of statins appear to involve restoring or improving endothelial function by increasing the bioavailability of NO; promoting re-endothelization; reducing oxidative stress; and decreasing the levels of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules (10, 11). Accordingly, Wassmann et al demonstrated that statins improve endothelium-dependent coronary vasodilatation within 24 hours in the absence of significant cholesterol reduction (12). Thus, it is possible that the inflammatory and immune

responses provoked by sepsis could potentially be modulated by statins through these non-cholesterol-dependent effects.

The few studies on the use of statins in sepsis reported controversial results. In a small randomized clinical trial for simvastatin in patients with acute bacterial infection, no significant difference in the levels of inflammatory cytokines or the incidence of severe sepsis was observed between treated and untreated patients (13). In a randomized prospective trial, Kruger et al concluded that maintenance of prior statin therapy was not associated with attenuation of the inflammatory response or organ failure during sepsis (14). In contrast, Patel et al demonstrated that acute use of atorvastatin in statin-naïve individuals significantly reduced the likelihood of sepsis progressing to severe sepsis (15). Thus, the role of statins in patients with sepsis remains controversial. Moreover, statins' effect on the vascular endothelium and markers of inflammation during sepsis has not been directly studied.

The objective of the present study was to examine the effects of atorvastatin on endothelial-dependent flow-mediated dilatation (FMD) and on serum levels of interleukin (IL)-6, soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM)-1 and endothelin (ET)-1, serving as markers of endothelial function, in patients with severe sepsis or septic shock and without previous use of statins.

Methods

Patients and study design

This was a single-center, double-blind, randomized, placebo-controlled trial approved by the institutional ethics committee prior to its initiation. Written informed consent was obtained from each patient or legal representative. The study was registered as NCT00452608 at www.clinicaltrials.gov.

The study included adult patients admitted to the ICU of a tertiary teaching hospital within 24 hours of diagnosis of severe sepsis or septic shock. Sepsis was defined according to the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (16). Infection was defined as the presence of a pathogenic microorganism in a sterile milieu (such as the blood, abscess fluid, the cerebrospinal fluid or ascitic fluid) and/or clinically suspected infection, plus the administration of antibiotics. Severe sepsis was defined as sepsis in addition to at least one organ failure, except when that organ failure was already present 48 hours before the onset of sepsis. Septic shock was defined as sepsis with hypotension, even after initial volume expansion.

The exclusion criteria were the use of statin therapy during the six months preceding admission, an inability to receive enteral administration of the study drug, previous statin-induced myopathy or hypersensitivity reaction, any immunosuppressive therapy except steroid treatment, pregnancy, HIV infection, transaminase levels three-fold above the normal upper limit, chronic muscle disease or creatine kinase (CK) level elevation of more than 10 times the upper limit of the normal range, heart failure, chronic renal failure and hepatic failure.

Study protocol

The enrolled patients were randomly assigned to receive 80 mg of atorvastatin orally or a matching placebo once daily for three days. All investigators were blinded to the study-group assignments, and the computer-generated randomization list was kept separately. Allocation concealment was ensured using sequentially numbered vials containing atorvastatin or placebo. The patients, caregivers, data collectors, investigators and data analysts were blinded to the group assignments.

The first dose of atorvastatin or placebo was given as soon as possible after randomization and then continued daily until day three or until death, whichever occurred first. Capsules were administered orally, or the contents were emptied and dissolved in 20 ml of water and given by a feeding tube that was flushed with 20 ml of water. Enteral nutrition was paused for a period of two hours after study drug administration.

Blood samples were collected at baseline and at 24 and 72 hours after randomization. These samples were centrifuged and stored in aliquots frozen at -80°C for later analysis of biomarker levels. Flow-mediated dilatation was measured at baseline and at 24 and 72 hours after randomization, and the data were stored for later analyses. Lipid profile was assessed at baseline and at 72 hours after randomization.

Study medication was discontinued if the patient, next of kin or treating physician withdrew consent; if the patient developed suspected drug-induced hepatitis; or if a serum CK level became greater than or equal to 10 times the normal value. Serial blood samples were taken to monitor any serious adverse events

related to statin therapy.

Flow-mediated dilatation evaluation

Flow-mediated dilatation was assessed in the brachial artery. Measurements were obtained with the patient in the supine position, in an arm without venous or arterial lines. Brachial artery images were obtained using a high-frequency transducer (7.5-10 MHz) and a commercially available ultrasound system (Philips EnVisor; Philips, Andover, MA). Images were obtained simultaneously with electrocardiographic tracing and digitally recorded. To minimize operational errors, both the transducer and the arm were maintained in the same position during the entire procedure. Baseline images were recorded, and the brachial artery postero-anterior diameter was measured in diastole in three adjacent segments and at the best angle of interrogation to determine the intima-media thickness. This procedure was repeated for three consecutive beats. A pressure cuff was then placed on the forearm and inflated to 230-250 mm Hg for five minutes. The brachial artery diameter was measured again 45-60 seconds after sudden cuff deflation, following the study protocol (17). A mean of nine measurements of baseline and post-hyperemia diameters was used for statistical analysis. Flow-mediated dilatation was expressed as the relative change in brachial artery diameter during hyperemia and defined as $100 \times ([\text{post-hyperemia diameter} - \text{baseline diameter}] / \text{baseline diameter})$. Therefore, positive percentage values indicate vasodilation, whereas negative percentage values indicate constriction. Brachial artery diameter measurements were performed off-line, and immediately after the protocols were finished. As such, the operator was always blinded to the final clinical outcome. Intraobserver variability was measured by the same investigator in nine subjects, revealing excellent reproducibility between

examinations (mean variation of baseline diameter of 0.3 mm and mean FMD variation of 0.63%). These values are substantially below the differences observed between survivors and nonsurvivors and are in accordance with the guidelines of the International Brachial Artery Reactivity Task Force (17, 18).

Blood-derived markers

sVCAM-1 and IL-6 concentrations were quantified in plasma samples using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's recommendations. The sVCAM-1 detection limit ranged from 0.17-1.26 ng/ml, and the IL-6 detection limit ranged from 3-300 pg/ml. Quantitative determination of ET-1 levels in plasma samples extracted from patients was also performed using an ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to manufacturer's recommendations. The limit of detection for ET-1 was 4.2-117 pg/ml. Before the assay, plasma samples underwent solvent extraction (acetone: 1 N HCl: water [40:1:5]), were lyophilized in a centrifugal evaporator and were reconstituted in 0.25 ml of sample diluent. The same investigator performed these assays in duplicate in the Cardiovascular Research Laboratory.

Study outcomes

The primary outcome was the improvement of endothelial function, as assessed by temporal variation of FMD and of the plasma levels of sVCAM-1, IL-6 and ET-1. The secondary outcomes included the duration of vasopressor use, the length of stay in the ICU, the length of mechanical ventilation and hospital mortality.

Statistical analysis

Analyses were performed based on the intention-to-treat principle. Quantitative variables with a normal distribution are presented as the mean \pm standard deviation or the mean \pm standard error; categorical variables are expressed as absolute frequencies and percentages. Quantitative variables without a normal distribution are logarithmically transformed or are expressed as the median and interquartile range. A Student's *t* test, a chi-square test, Fisher's exact test or a Mann-Whitney U test was used for comparison between groups, as appropriate. To study the profile of variables over time, two-way analyses of variance for repeated measures were implemented using general linear models (SAS Software 8.0; SA, Cary, NC). Based on previous data (11), the study was powered to detect a difference of 25% in FMD and plasma levels of biomarkers between the treatment and the control patient groups, with 80% power at a significance level of 0.05.

Results

A total of 201 patients were identified during the screening process. In total, 154 patients were excluded, of whom 16.5% (43) met more than one study exclusion criterion. Approximately 29.8% (60) of patients were excluded due to current treatment with statins, and 53.7% (108) were excluded due to a sepsis diagnosis for more than 24 hours. Ultimately, 47 patients were randomized to receive atorvastatin or placebo (Figure 1) (19).

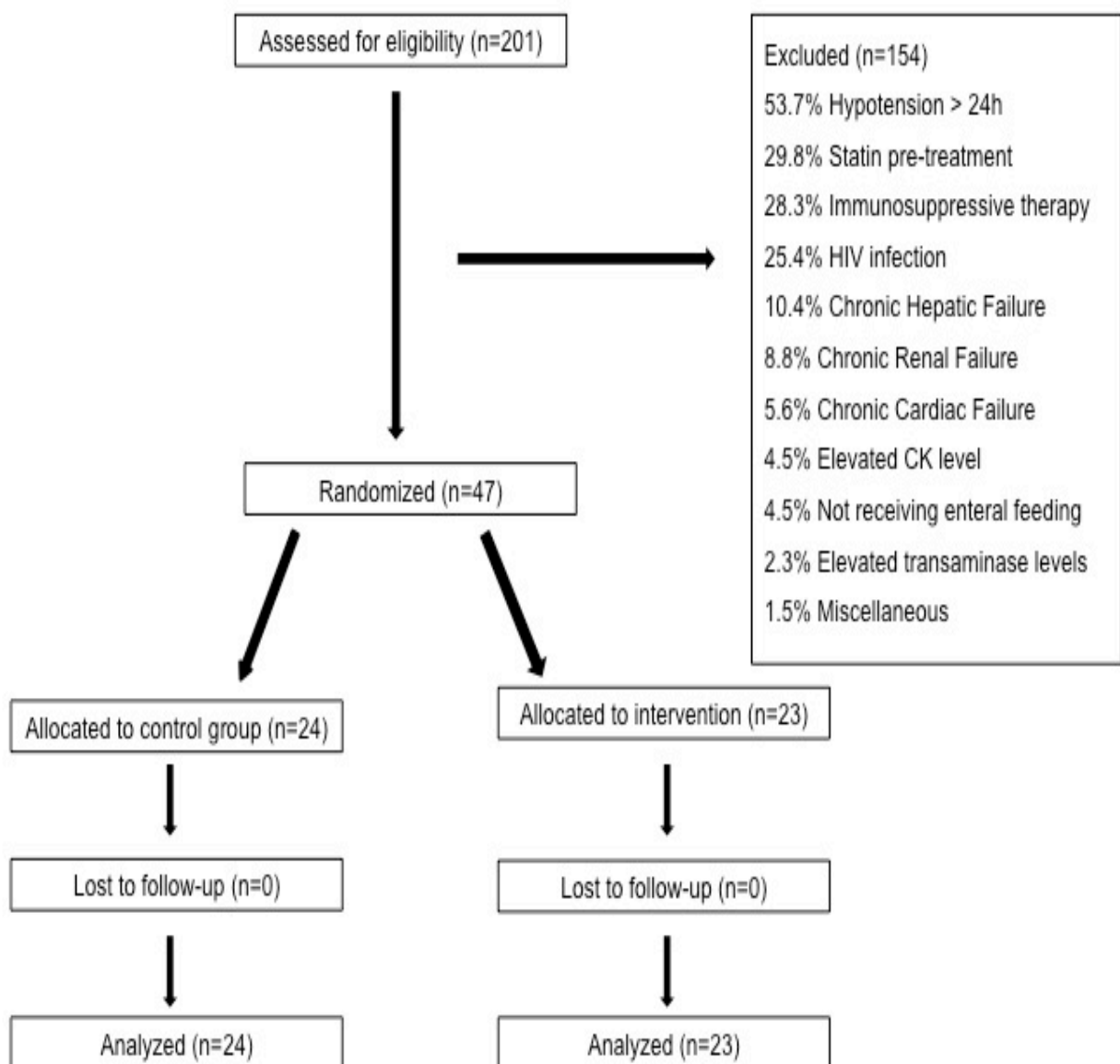


Figure 1. Screening, enrollment and randomization of the study patients. A total of 201 septic patients were identified. In total, 154 patients were excluded, mostly due to current treatment with statins or a sepsis diagnosis for more than 24 hours. Ultimately, 47 patients were randomized (24 into the placebo group and 23 into the statin group). No patients were lost to follow-up.

Baseline patient demographics, including the etiology and severity of sepsis, are shown in Table 1. The majority of subjects in each group (47.8% in the statin group and 70.8% in the placebo group, $p = 0.1$) were female. The groups were well matched for age, the severity of sepsis and severity of illness scores.

Table 1. Baseline characteristics of the patient population

	All pts (n = 47)	Atorvastatin (n = 23)	Placebo (n = 24)	p
Age (yrs)	50.3 ± 18.7	49.5 ± 18	51 ± 20	0.77 ^b
Female sex % (n)	59.6 (28)	47.8 (11)	70.8 (17)	0.10 ^a
Source of sepsis % (n)				
Abdomen	36 (17)	39.1 (9)	33.3 (8)	
Lungs	32 (15)	39.1 (9)	25 (6)	0.11
Urinary	12.7 (6)	0 (0)	25 (6)	
Other	19 (9)	21.7 (5)	16.6 (4)	
APACHE II	23.3 ± 7	23 ± 6.9	23.5 ± 7.3	0.81 ^b
Use of corticosteroids % (n)	66 (31)	76.4 (17)	58.3 (14)	0.26 ^a
Use of vasopressors % (n)	89 (42)	82.6 (19)	95.8 (23)	0.14 ^a
Time from shock until study entry (h)	16.7 ± 5.4	17.1 ± 5.9	16.4 ± 5	0.65 ^b
Mechanical ventilation % (n)	85 (40)	95.6 (22)	75 (18)	0.17 ^a
Creatinine (mg/dl)	1.79 ± 1.48	1.9 ± 1.6	1.7 ± 1.4	0.65 ^b
TC (mg/dl)	84.34 ± 26.95	84.9 ± 28.8	83.7 ± 25.6	0.88 ^b
TG (mg/dl)	186.7 ± 135.6	183.3 ± 130.5	189.8 ± 143	0.87 ^b
LDL (mg/dl)	27.4 ± 10.9	24 ± 8	30.7 ± 12	0.03 ^b
HDL (mg/dl)	14.5 ± 9.2	13 ± 8	14.3 ± 7.7	0.29 ^b
sVCAM-1 (ng/ml)	2317.1 ± 233.48	2509 ± 414.99	2158 ± 264.80	0.88 ^{b,c}
ET-1 (pg/ml)	8.4 ± 1.03	7.4 ± 0.68	9.5 ± 1.83	0.5 ^{b,c}
IL-6 (pg/ml)	252.3 ± 16.30	256 ± 23.92	256 ± 22.35	0.57 ^{b,c}
FMD % variation	2.45 ± 0.1	1.6 ± 1.4	3.1 ± 1.2	0.47 ^{b,c}

The data are expressed as the mean ± SD or mean ± SE. a = Pearson chi-square test; b = *t* test; c = standard error. Abbreviations: APACHE II = Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; TC = total cholesterol; TG = triglyceride; LDL = low-density lipoprotein; HDL = high-density lipoprotein; sVCAM-1 = soluble vascular cell adhesion molecule-1; ET-1 = endothelin-1; IL-6 = interleukin-6; FMD = flow-mediated dilatation.

Except for low-density lipoprotein (LDL) levels, which were higher in the placebo group (24 ± 8 vs. 30.7 ± 12 mg/dL; $p = 0.03$), no differences in baseline plasma total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL) or triglyceride (TG) levels were observed between groups (Table 2). Additionally, no differences were observed over time in the plasma levels of TC, TG, LDL and HDL between the patients taking atorvastatin and the controls ($p = 0.85, 0.38, 0.56$ and 0.99 , respectively). However, there was a significant increase in the TC levels of the placebo and treatment groups from baseline to assessment at 72 hours ($p = 0.001$ and 0.005 , respectively). The HDL and LDL levels tended to increase in patients taking atorvastatin, although not significantly ($p = 0.09$).

Table 2. Serum lipid and lipoprotein levels in the statin and placebo groups at baseline and after 72 hours

	Atorvastatin (n = 23)			Placebo (n = 24)			
	Baseline	72 h	p ¹	Baseline	72 h	p ²	p ³
TC (mg/dl)	84.9 ± 28.8	112.2 ± 29.8	0.005	83.7 ± 25.6	114.2 ± 39.6	0.001	0.85
TG (mg/dl)	183.3 ± 130.5	159.8 ± 77.8	0.34	189.8 ± 143	187 ± 119.2	0.85	0.38
LDL (mg/dl)	24 ± 8	27.9 ± 9.3	0.09	30.7 ± 12	26.3 ± 8.8	0.14	0.56
HDL (mg/dl)	13 ± 8	16.7 ± 12.8	0.09	14.3 ± 7.7	16.7 ± 8.8	0.7	0.99

The data are expressed as the mean ± SD (50% CI)

The p¹ and p² values refer to comparisons between baseline and 72 hours within the statin and placebo groups, respectively

The p³ values refer to comparisons at 72 hours between the statin and the placebo groups

Abbreviations: TC = total cholesterol; TG = triglyceride; LDL = low-density lipoprotein; HDL = high-density lipoprotein.

Primary outcomes

The patients had severe impairment of endothelial function, as assessed by brachial artery FMD at baseline (median variation $2.45 \pm 0.1\%$). This impairment was greater in the patients allocated to the atorvastatin group, although not significantly ($1.67 \pm 1.4\%$ vs. $3.1 \pm 1.2\%$, $p = 0.47$). There was a progressive improvement over time, although not significant, in endothelial function in both groups (p time = 0.13 and p group = 0.23). There was no significant interaction between the group-related and the time-related variation of FMD ($p = 0.6$; Figure 2).

Although we observed a trend of increased mortality rates in patients with baseline FMD lower than 7% (the internationally accepted cutoff point (17, 18)) or lower than 5.7% (the study median), statistical significance was not achieved for the comparison between survivors and nonsurvivors ($p = 0.28$ and $p = 0.16$, respectively). Whereas 82% (9/11) of patients with baseline FMD greater than 7% survived, approximately half of patients with baseline FMD lower than 7% died (41%; 15/35). Similarly, among patients with less than 5.7% baseline FMD (35/47), mortality was 43% (15/35), whereas 83% of patients with baseline FMD greater than 5.7% survived. Nonetheless, 70.6% of nonsurvivors showed a decrease in endothelial function in FMD sequential analyses (comparisons between baseline measurements and measurements after 24 or 72 hours), whereas only 33.3% of survivors had a reduction in FMD ($p = 0.018$).

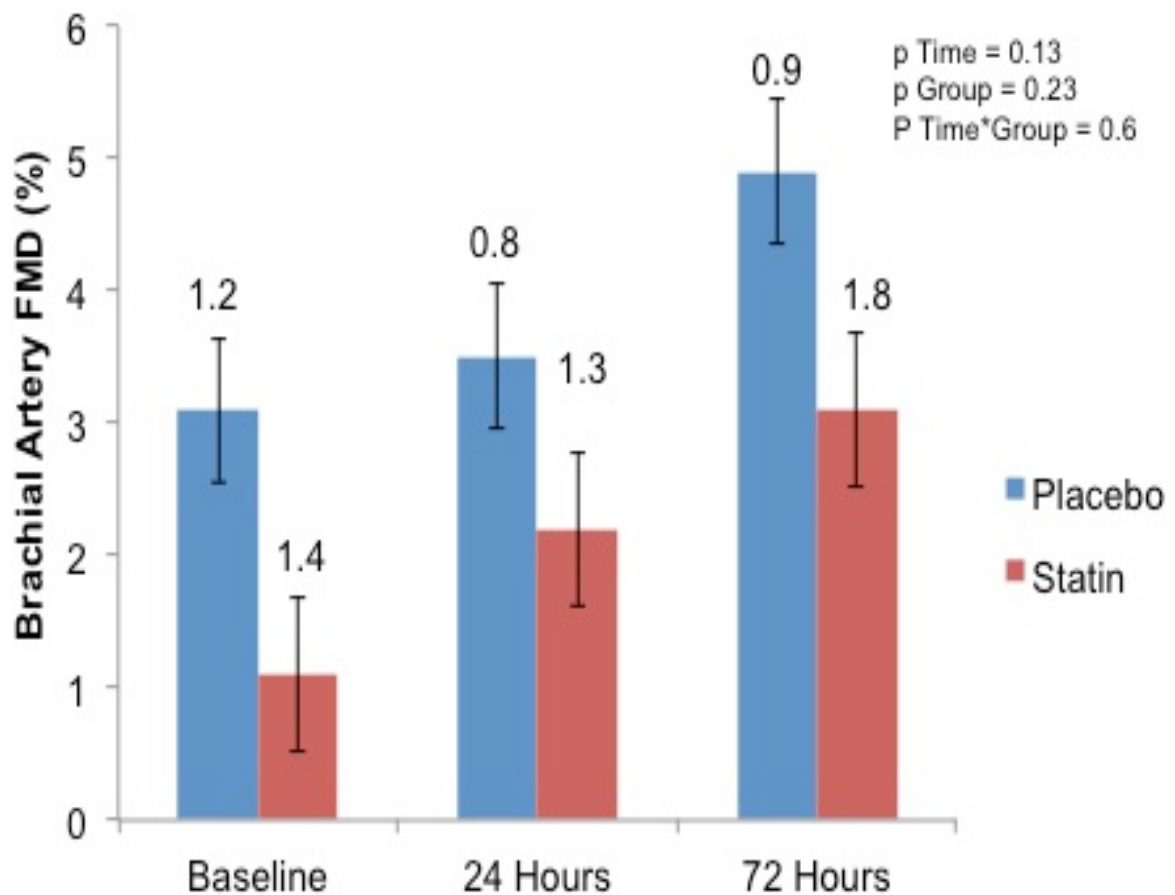


Figure 2. Temporal variation of FMD. Endothelial function was assessed based on brachial artery FMD at baseline and at 24 and 72 hours in the placebo (blue bars) and atorvastatin (red bars) groups. The temporal variation of FMD between the placebo and the atorvastatin groups was assessed by two-way analyses of variance for repeated measures using general linear models. The data are the mean \pm SE.

Figure 3 depicts biomarker levels over time in patients on atorvastatin or placebo. Plasma sVCAM-1 levels showed significant time and group interaction variation between groups (p for interaction = 0.04). However, no differences were noted when only the time points or groups were compared (p = 0.1 and 0.82, respectively). Plasma sVCAM-1 levels at baseline (nonsurvivors, 3108 ± 546.14 ng/ml; survivors, 1893 ± 223.24 ng/ml; p = 0.017) and at 24 hours (nonsurvivors, 3463 ± 610.12 ng/ml; survivors, 1789 ± 181.31 ng/ml; p = 0.002), but not at 72 hours (nonsurvivors, 2623 ± 685.65 ng/ml; survivors, 1703 ± 186.98 ng/ml; p = 0.17), were related to hospital mortality.

Regarding plasma IL-6 levels, there was no difference between groups (p = 0.43) and no significant interaction between group and time (p = 0.8). However, in the cohort as a whole, there was a statistically significant difference in plasma IL-6 levels between time points (p < 0.001). IL-6 levels at baseline (nonsurvivors, 297 ± 20.99 pg/ml; survivors, 228 ± 21.24 pg/ml) and at 24 hours (mean for nonsurvivors, 208 ± 39.66 pg/ml; mean for survivors, 119 ± 20.43 pg/ml), but not at 72 hours (nonsurvivors, 92 ± 28.10 pg/ml; survivors, 58 ± 12.29 pg/ml), were related to hospital mortality (p = 0.042, p = 0.033 and p = 0.20, respectively).

For ET-1 levels, there was also no overall difference between groups or time points (p = 0.97 and p = 0.28, respectively). Although there was no significant difference in the level of ET-1 at 72 hours between treated and untreated patients, the values tended to be higher in the statin group over time (p for interaction time and group = 0.08). No significant correlation was observed concerning ET-1 levels and hospital mortality.

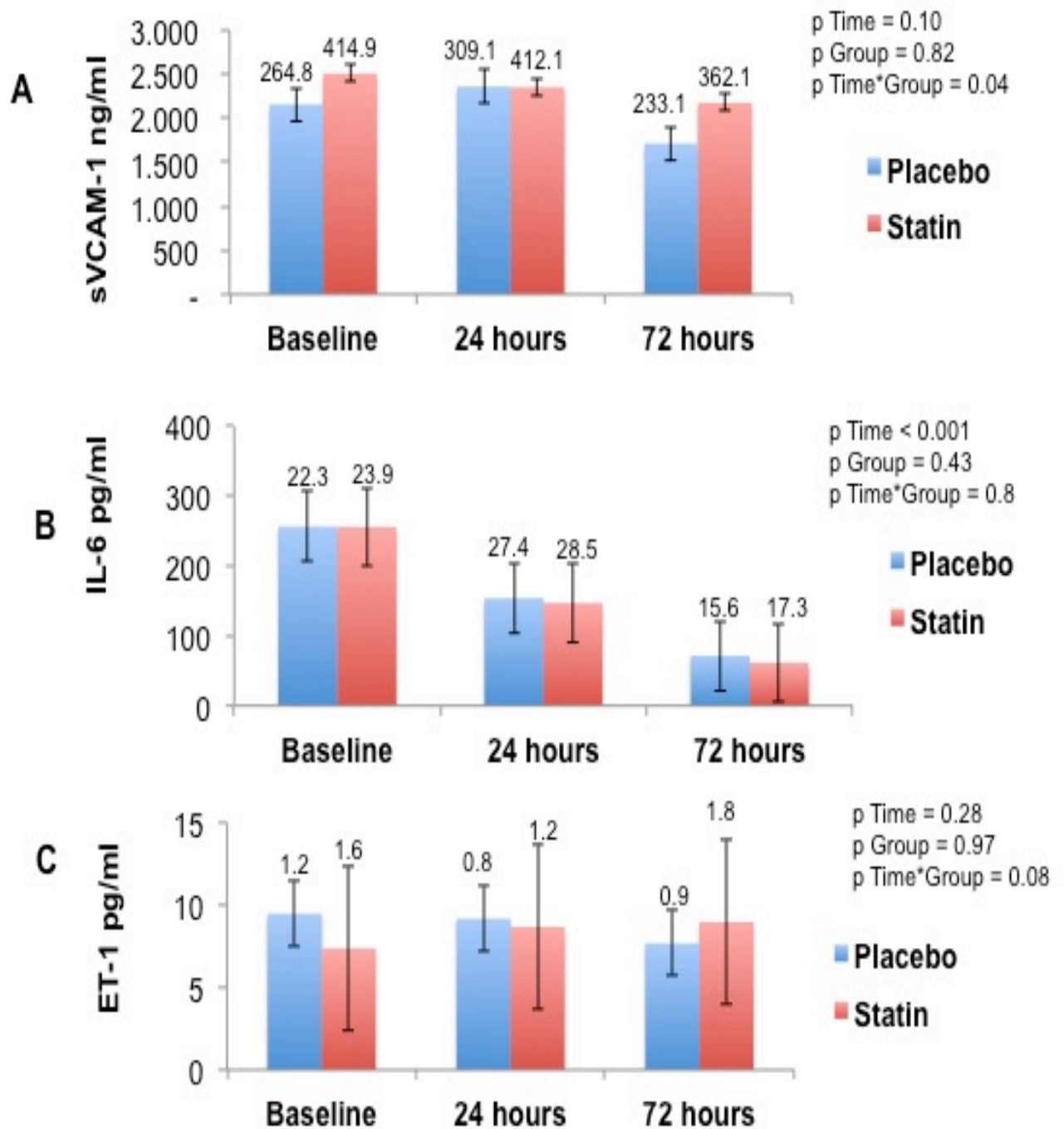


Figure 3. Profile of biomarkers of endothelial dysfunction. Patients with severe sepsis or septic shock were treated with 80 mg of atorvastatin (red bars) or placebo (blue bars). (A) Temporal variation of sVCAM-1 levels. (B) Temporal variation of IL-6 levels. (C) Temporal variation of ET 1 levels. The data are the median \pm SE.

Secondary outcomes

Table 3 describes the secondary outcomes of the study. The mean time on vasopressors was similar between patients on atorvastatin and patients on placebo (36.75 hours, interquartile range 6.5-36.75 vs. 34.9 hours, interquartile range 20.6-68.6; $p = 0.88$). The median length of ICU stay was six days (interquartile range 3-15) and 4.5 days (interquartile range 3-16) in the statin and placebo groups, respectively ($p = 0.89$). No significant difference was observed in the duration of mechanical ventilation use among the patients in each group. The overall cohort had a hospital mortality of 36.2%. There were fewer deaths in the statin group than in the placebo group (6/23 [26%] and 11/24 [45.5%], respectively), however, no significant difference was observed ($p = 0.16$).

Table 3. Secondary Outcomes

	Atorvastatin	Placebo	p
	(n=23)	(n=24)	
Time on vasopressor - hours	36.75 [6.5-36.75]	34.9 [20.6-68.6]	0.88 ^a
LOS on mechanical ventilation – days	3 [2-7]	3 [0.25-5.5]	0.90 ^a
LOS on ICU – days	6 [3-15]	4.5 [3-16]	0.89 ^a
Hospital mortality - % (n)	26% (6)	45.8% (11)	0.16 ^b

The data are expressed as the median and interquartile range (IQR), except for hospital mortality (mean and SD).

a = Independent-samples median test.

b = Chi-square test.

Abbreviations: ICU = intensive care unit; LOS = length of stay.

Adverse events

In this study, 80 mg daily of atorvastatin daily for a short time was well tolerated (Table 4). The incidence of serious adverse events was similar between the atorvastatin and the placebo groups. The study drug was discontinued when CK levels were greater than 10 times the upper limit of the normal range in one patient in the atorvastatin group and in one patient in the placebo group. In both cases, CK levels decreased to normal values over several days. There was no difference in the frequency of elevated CK or liver transaminase levels between the two groups. No unexpected serious adverse reactions occurred during the study.

Table 4. Safety profile of the treatment group

	Atorvastatin (n = 23)	Placebo (n = 24)	p
ALT at baseline (U/L)	22 [13 - 34]	25.5 [16 - 66]	0.88 ^a
ALT peak (U/L)	29 [18 - 46]	48 [18.7 - 84]	0.66 ^a
AST at baseline (U/L)	27 [20 - 47]	40 [26 - 120]	0.87 ^a
AST peak (U/L)	47 [29 - 61]	50 [34 - 195]	0.88 ^a
CPK at baseline (U/L)	256 [141 - 360]	304 [81 - 575]	0.65 ^a
CPK peak (U/L)	367 [204 - 700]	349 [124 - 1520]	0.88 ^a

The data are expressed as the median and interquartile range (IQR).

a = Independent-samples median test.

Abbreviations: ALT = alanine transaminase; AST = aspartate transaminase;

CK = creatinine kinase.

Discussion

The main finding of this randomized trial was that the use of atorvastatin was not associated with beneficial effects on endothelial function or markers of inflammation in patients with severe sepsis or septic shock. Additionally, no clinical benefit with the use of atorvastatin was observed during the study period of three days or by critical care discharge. To our knowledge, this is the first randomized study addressing endothelial function in patients with advanced sepsis who were not previously exposed to statins.

Characteristics of study patients

Our study patients had severe sepsis or septic shock and were included within 24 hours of sepsis onset. Because sepsis development can be devastating, we were careful to only include patients in the early stages of the syndrome to act as early as possible on the multiple inflammatory pathways triggered in the process. To date, no randomized clinical trial has attempted to study such a severely ill group of patients regarding the effects of statins on endothelial function. Nonetheless, several studies have addressed the use of statins and bacterial infections with and without sepsis, most of which were retrospective studies (20-25). Therefore, comparisons between our data and the findings of other studies with different designs and patient characteristics may not reflect true differences in outcomes. Patients in the present study had several features of severity, with an approximately 30% hospital mortality rate, a mean APACHE II score of 23, predominantly abdominal and respiratory sepsis and a relatively young age stratum (50 years old on average).

In this critically ill population, we found very low baseline cholesterol levels. Gordon and colleagues, among others, have reported that low cholesterol levels are

associated with poorer survival rates in critically care settings (26). It remains unclear whether this finding indicates significant physiopathological changes or merely reflects the degree of acute illness (27). We showed that in groups with or without atorvastatin, there was a progressive, similar increase in lipid levels during the observation period of the study, as expected when sepsis progressively subsides (28).

Assessment of flow-mediated endothelial dilatation

The use of vascular ultrasound to study endothelial function in sepsis has only been recently studied. Vaudo and colleagues studied 45 patients with gram-negative sepsis and showed that in the one-third of patients in whom endothelial dysfunction was present at baseline, the sepsis score had worsened over a three-day period compared with the score of patients without endothelial dysfunction (29).

Our group previously studied the baseline characteristics of FMD in patients with sepsis or septic shock compared with control individuals. Similar to the study by Vaudo and co-workers, although our patient sample appeared to be more severely ill, we showed that deterioration of FMD was predictive of poor prognosis (30).

In the present study, both the control and the atorvastatin-treated groups had baseline values of FMD that indicated severe endothelial impairment compared with control values from our previous work (30). In both groups, there was a progressive improvement in FMD values at 24 and 72 hours, which was similar in magnitude between the groups. However, changes in FMD over time were indicators of patients with a higher mortality rate: 70% of nonsurviving patients had reduced FMD values, whereas FMD values decreased in only 30% of survivors. Ultimately, the use of atorvastatin did not significantly improve endothelial function.

Previous studies have extensively studied the effects of different statins on endothelial function, as assessed based on FMD. Most studies included patients suffering from acute coronary syndromes, chronic coronary artery disease, dyslipidemia or heart failure (11, 31, 32). In the majority of these settings, the use of statins, regardless of the specific type, was associated with overall improvement in FMD values, irrespective of changes in cholesterol levels (33, 34). The potential benefits of statins for the vascular endothelium are mainly based on the positive influence of these drugs on the NO pathway by increasing eNOS expression (35). However, as most authors agree, the delicate balance of NO determinants, and particularly eNOS and iNOS status, is variable and dynamic in the progression of severe infections (36). It is possible that the patients in our study were experiencing severe and extensive bacterial aggression, explaining why an external agent such as a statin could not so rapidly and markedly interfere with the intense inflammatory cascade, resulting in improved endothelial function.

Assessment of endothelial function based on circulating levels of biomarkers

Endothelial inflammation-mediated activation is regarded as predictive of worse prognosis in sepsis (37). We chose to perform a comprehensive assessment of inflammatory markers that could provide a noninvasive evaluation of endothelial function by measuring sVCAM-1, IL-6 and ET-1 levels in our study patients. In addition, to circumvent potential technical limitations in performing FMD assessment at the bedside of critically ill patients, biological markers of endothelial dysfunction could be used as surrogate endpoints of this phenomenon.

We have previously described sVCAM-1 as a potential marker of endothelial dysfunction in the setting of coronary artery disease and observed its utility in

identifying coronary disease prior to the development of significant atherosclerotic plaques (38). In the present study, none of these markers, which were, as expected, elevated at baseline in both groups, seemed to be influenced by the use of atorvastatin. In contrast, Novack and colleagues demonstrated reduction in the levels of IL-6 and TNF- α over time in patients using simvastatin at 40 mg in a clinical trial of patients with bacterial infections, although no difference was observed compared with the placebo group (39). Differences in these findings compared with our data could largely be due to the inclusion criteria related to severe sepsis and septic shock in our study, whereby the intensity of the inflammatory cascade was potentially less amenable to drug intervention.

Both IL-6 and sVCAM-1 levels featured a tendency to diminish during the observation period of the study. Additionally, both IL-6 and sVCAM-1 levels at baseline and 24 hours appeared to be predictive of hospital death. Taken together, these observations are in agreement with previous studies, indicating that early activation of cytokine and adhesion molecule cascades is associated with poor prognosis in bacterial infections, and in sepsis in particular (37, 40-42).

Finally, ET-1 levels, a marker of intensive vasoactivation and endothelial dysfunction, were also not affected by the use of atorvastatin. These levels were elevated at baseline, yet in contrast to other markers, we did not observe a progressive reduction in ET-1 levels over time or a correlation between this marker's circulating pattern and mortality. Studies on ET-1 and sepsis in humans are scarce. An earlier study from our group showed that ET-1 levels were predictive of worse prognosis in sepsis (43). More recently, we reported that levels of ET-1 were associated with the degree of left ventricular dilatation, but not prognosis, in patients with sepsis (44). Our present data confirm these initial observations.

In sepsis and bacterial infection scenarios, several retrospective studies, observational cohorts and even experimental studies indicated beneficial effects of statins in a wide range of outcomes. More recently, meta-analyses and systematic reviews also suggested positive effects for these drugs, reducing the burden of infectious complications in various clinical scenarios (45-47). Nonetheless, due the heterogeneity of the data available, the need for randomized clinical trials has been discussed among many different authors (48-50). In the present study, we showed that atorvastatin was not associated with improvement in any clinically significant outcomes, such as the time on vasopressors, the need for mechanical ventilation or the length of stay in the ICU. Overall, findings of endothelial dysfunction, regardless of group allocation, were indicative of worse prognosis. Our data reinforce the idea that larger studies are warranted, preferentially with more homogenous study populations, i.e., patients with no previous exposure to statins who are well stratified according to the degree of sepsis severity. Such trials are needed, based on our experience with a high dose of atorvastatin, for which no complications were detected (neither renal nor hepatic failure). Future studies should fully explore this high drug dose with a desirable safety profile.

Study limitations

Analyses of our data require several technical considerations. First, the study was interrupted prior to obtaining the anticipated ideal sample size due to an excessively slow recruitment rate that was caused by changes in the epidemiological characteristics of our ICU patients. Second, most patients were using vasoactive agents, which may have impaired assessment of changes in FMD. However, by measuring biological endothelial markers, we found a consistent non-response to atorvastatin, similar to the results observed for the FMD values. Third, the use of medications *per oral* in patients using vasopressors may have negatively influenced intestinal absorption, and the relatively short duration of the study may have limited the appearance of therapeutic benefits.

Conclusions

This randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial failed to demonstrate clear positive benefits of atorvastatin at 80 mg, initiated as early as 24 hours after sepsis onset, on endothelial function, as assessed based on FMD and inflammatory marker levels. Considering that this small randomized trial presents novel information that contradicts most previous data in the field, larger prospective, multi-center, controlled studies are warranted to help to address this important clinical question involving the use of statins in severe sepsis and septic shock.

References

1. Elixhauser A, Friedman B, Stranges MS. Septicemia in U.S. Hospitals, 2009. HCUP Statistical Brief #122. Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD. October 2011.
2. Pavon A, Binquet C, Kara F, et al. Profile of the risk of death after septic shock in the Present era: an epidemiological study. *Crit Care Med*. 2013;41(11):2600-9.
3. Lagu T, Rothberg M, et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*. 2012;40(2):1-8.
4. Vincent J-L, Zhang H, Szabo C, et al. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1782-5.
5. Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: Source of and a target for inflammation. *Crit Care Med*. 2001;29(7(suppl)):S21-S7.
6. Dellinger RP. Inflammation and Coagulation: Implications for the septic patient. *Clin Infect Dis*. 2003;36:1259-65.
7. Bateman RM, Walley KR. Microvascular resuscitation as a therapeutic goal in severe sepsis. *Crit Care*. 2005;9(Suppl. 4):S27-S32.
8. Schönbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors - statins as antiinflammatory agents? *Circulation*. 2004;109[supl II]:II-18-II26.
9. Marz, WK. HMG-CoA reductase inhibition: anti-inflammatory effects beyond lipid lowering? *Journal of Cardiovascular Risk*. 2003;10:169-79.
10. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:729-36.

- 11.** Nawawi H, Osman NS, Annuar R, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 levels reflect endothelial dysfunction in patients with primary hypercholesterolaemia treated with atorvastatin. *Atherosclerosis*. 2003;169:283-91.
- 12.** Wassmann S, Faul A, Hennen B, et al. Rapid effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition on coronary endothelial function. *Circ Res*. 2003;93:98-103.
- 13.** Novack V, Eisinger M, Frenkel A, et al. The effects of statin therapy on inflammatory cytokines in patients with bacterial infections: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Intensive Care Med*. 2009;35(7):1255-60.
- 14.** Kruger PS, Harward ML, Jones MA, et al. Continuation of statin therapy in patients with presumed infection: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(6):774-81.
- 15.** Patel JM, Snaith C, Thickett DR, et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of 40 mg/day of atorvastatin in reducing the severity of sepsis in ward patients (ASEPSIS Trial). *Crit Care*. 2012;16(6):R231.
- 16.** ACCP-SCCM. Consensus Conference: Definitions of sepsis and multiple organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*. 1992;20:864-74.
- 17.** Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(2):257-65.
- 18.** Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, et al. Flow-mediated vasodilation - a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest*. 2005;127:2254-63.

19. Altman DG, Schulz KF, Moher D, et al. The revised CONSORT statement for reporting randomized trials: explanation and elaboration. *Ann Intern Med.* 2001;134:663-94.
20. Kruger P, Fitzsimmons K, Cook D, et al. Statin therapy is associated with fewer deaths in patients with bacteremia. *Intensive Care Med.* 2006;32(1):75-9.
21. Forrest GN, Kopack AM, Perencevich EN. Statins in candidemia: clinical outcomes from a matched cohort study. *BMC Infect Dis.* 2010;10.
22. Liappis AP, Kan VL, Rochester CG, et al. The effect of statins on mortality in patients with bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1352-7.
23. Almog Y, Novack V, Eisinger M, et al. The effect of statin therapy on infection-related mortality in patients with atherosclerotic diseases. *Crit Care Med.* 2007;35(2):372-8.
24. Thomsen R, Riis A, Kornum J, et al. Preadmission use of statins and outcomes after hospitalization with pneumonia: population-based cohort study of 29,900 patients. *Arch Intern Med.* 2008;168:2081-7.
25. Yende S, Milbrandt EB, Kellum JA, et al. Understanding the potential role of statins in pneumonia and sepsis. *Crit Care Med.* 2011;39(8):1871-8.
26. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, et al. Relationship of hypolipidemia to cytokine concentrations and outcomes in critically ill surgical patients. *Crit Care Med.* 2001;29:1563-8.
27. Marik PE. Dyslipidemia in the Critically Ill. *Crit Care Clin.* 2006;22:151-9.
28. Dunham CM, Fealk MH, Sever WE. Following severe injury, hypocholesterolemia improves with coalescence but persists with organ failure or onset of infection. *Crit Care.* 2003;7:R145-53.

- 29.** Vaudo G, Marchesi S, Siepi D, et al. Human endothelial impairment in sepsis. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):747-52.
- 30.** Becker L, Prado K, Foppa M, et al. Endothelial dysfunction assessed by brachial artery ultrasound in severe sepsis and septic shock. *J Crit Care*. 2012;27(3):316.e9-14.
- 31.** Tousoulis D, Antoniades C, Bosinakou E, et al. Effects of atorvastatin on reactive hyperemia and inflammatory process in patients with congestive heart failure. *Atherosclerosis*. 2005;178:359-63.
- 32.** Vita JA, Gokce N, Duffy SJ, et al. Effect of atorvastatin on endothelium-dependent vasodilatation in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2003;91:857-60.
- 33.** Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, et al. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:234-41.
- 34.** John S, Delles C, Jacobi J, et al. Rapid improvement of nitric oxide bioavailability after lipid-lowering therapy with cerivastatin within two weeks. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:1351-8.
- 35.** Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003;58:719-31.
- 36.** McGown CC, Brookes ZL. Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. *Br J Anaesth*. 2007;98(2):163-75.
- 37.** Wang HE, Shapiro NI, Griffin R, et al. Inflammatory and endothelial activation biomarkers and risk of sepsis: A nested case-control study. *J Crit Care*. 2013;28:549-55.

- 38.** Clausell N, Prado K, Ribeiro JP. Increased plasma levels of soluble vascular cellular adhesion molecule-1 in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Int J Cardiol.* 1998;68:275-80.
- 39.** Novack V, Eisinger M, Frenkel A, et al. The effects of statin therapy on inflammatory cytokines in patients with bacterial infections: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Intensive Care Med.* 2009;35:1255-60.
- 40.** Oda S, Hirasawa H, Shiga H, et al. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine.* 2005;29:169-75.
- 41.** Cowley H, Heney D, Gearing A, et al. Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study. *Crit Care Med.* 1994;22(4):651-7.
- 42.** Jaber S, Hamed E, Hamed S. Adhesion molecules levels in serum and cerebrospinal fluid in children with bacterial meningitis and sepsis. *J Pediatr Neurosci.* 2009;4(2):76-85.
- 43.** Brauner JS, Rohde L, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor- α : early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2000;26(3):305-13.
- 44.** Furian T, Aguiar C, Prado K, et al. Ventricular dysfunction and dilation in severe sepsis and septic shock: relation to endothelial function and mortality. *J Crit Care.* 2012;3(319):e9-15.
- 45.** Janda S, Young A, FitzGerald JM, et al. The effect of statins on mortality from severe infections and sepsis: A systematic review and meta-analysis. *J Crit Care.* 2010;25:(656)e7-e22.

46. Björkhem-Bergman L, Bergman P, Andersson J, et al. Statin treatment and mortality in bacterial infections – a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2010;5(5):102-107.
47. Tleyjeh IM, Kashour T, Hakim FA, et al. Statins for the prevention and treatment of infections: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2009;169(18):1658-67.
48. Van den Hoek HL, Bos WJ, Boer A, et al. Statins and prevention of infections: systematic review and meta-analysis of data from large randomised placebo controlled trials. *BMJ*. 2011;343:d7281.
49. Drage SM, Barber V, Young JD. Statins and sepsis: panacea or Pandora's box? *Lancet*. 2007;7:80.
50. Al Harbi SA, Tamim HM, Arabi YM. Association between statin therapy and outcomes in critically ill patients: a nested cohort study. *BMC Clin Pharmacol*. 2011;11:12.