



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Thiago Corrêa

Disfunção cardíaca durante a sepse: da fase aguda à sobrevivência

Florianópolis
2021

Thiago Corrêa

Disfunção cardíaca durante a sepse: da fase aguda à sobrevivência

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Corrêa, Thiago

Disfunção cardíaca durante a sepse: da fase aguda à sobrevivência / Thiago Corrêa; orientador, José Eduardo da Silva Santos, 2021.

119 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Sobreviventes à sepse. 3. Insuficiência cardíaca. 4. Sepse. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Eduardo da Silva Santos, José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. III. Título.

Thiago Corrêa

Disfunção cardíaca durante a sepse: da fase aguda à sobrevivência

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Rubens Fazan Junior, Dr.
Instituição Universidade de São Paulo

Prof. Jamil Assreuy, Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Daniel Fernandes, Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos,
Orientador

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus amigos de LabCardio, da Saúde e da Vida. Ele só foi possível graças aos ensinamentos da minha família e apoio daqueles que eu amo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a sabedoria e força que Deus me possibilitou durante todas as etapas, pois sem a fé me fortificando, teria desistido na primeira queda.

Aos meus pais, Ademir e Odilea. Os amo incondicionalmente, hoje mais que ontem e menos que amanhã. Sou os seus ensinamentos, sou parte viva de vocês, e se alcancei esse objetivo foi porque vocês estiveram comigo, Obrigado!

À minha grande amiga e irmã Gisele, ao meu lado me apoiando e ensinando a aprender a partir dos diferentes, se erguer em cima das dificuldades e amar as pessoas como elas são.

Aos meus sobrinhos, João e Serena. Eles me tornaram um ser menos egoísta e com mais amor, devo minha grande mudança a vocês. Se hoje minha vida faz sentido, é devido ao amor, vocês me fizeram acreditar que ele existe incondicionalmente.

A “mami”, Isabel, mulher maravilhosa que me adotou como filho, assumiu essa responsabilidade e esteve ao meu lado, foi paciente e se tornou parte da minha vida.

Ao Bruno Castilho Resende e sua mãe Irinea, minha família, que esteve sempre me estimulando nos momentos de cansaço, se recusando a aceitar os meus devaneios e ameaças de largar tudo. Vocês fazem parte de mim, deste trabalho da vida que almejo.

À Karla Guarido, minha doutora preferida, que proporcionou estímulo e me ajudou a não desistir. Confiou nas minhas ideias e sempre esteve ali para me apoiar, para me abraçar, para me escutar e me amar. Amiga você sempre estará no meu coração.

Ao meu orientador, que nesses 10 anos esteve sempre ao meu lado como um verdadeiro mestre, um doutor na arte de ensinar.

Aos Professores do Doutorado que confiaram no meu potencial e entenderam minhas dificuldades em conciliar o trabalho, a pandemia e os estudos.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Angélica, Ruy, Nariana, Natalia, Elaine, Adriane e aos amigos do Departamento de Farmacologia da UFSC e Unidade de Pronto Atendimento UPA-CIS.

... Obrigado!

“Digam o que disserem! Prefiro ser um homem de paradoxos que um homem de preconceitos.”

(Jean-Jacques Rousseau, 2004).

RESUMO

A sepse é uma doença com elevadas taxas de morbidades e mortalidade, decorrentes de um processo infeccioso responsável por promover uma resposta inflamatória sistêmica não compensada, a qual contribui para a instalação de déficits funcionais em diversos sistemas orgânicos. Entre as disfunções provocadas pela sepse destacam-se as insuficiências cardíacas do tipo sistólica e diastólica. Apesar da severidade desta doença muitos pacientes sobrevivem, se recuperam e alcançam a alta hospitalar. Entretanto, os sobreviventes à sepse, apresentam aumento substancial das necessidades de saúde, sendo os eventos cardiovasculares uma causa importante para o aumento da mortalidade e re-hospitalização. Embora tenha-se o entendimento sobre os impactos da doença em longo prazo, poucas publicações abordam o tema, sobreviventes à sepse. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo descrever as principais alterações cardíacas decorrentes da sepse, induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco, em animais sobreviventes. Para isso, foram utilizados ratos *Wistar*, submetidos à CLP, nos tempos de 6 e 24 horas (considerada a fase aguda), 72 horas e 15 dias (considerada a fase de aparente recuperação) e 30 dias (considerados sobreviventes à sepse), onde foram avaliados os parâmetros cardíacos através da técnica de cateterismo cardíaco intraventricular e coração isolado. Além das avaliações dos parâmetros basais, também foram avaliadas as respostas cardíacas aos agentes fenilefrina e dobutamina, e as alterações presentes entre as espécies reativas de oxigênio. Na fase aguda os animais CLP apresentaram hipotensão arterial, elevada pontuação no score para sepse e disfunção cardíaca do tipo sistólica, caracterizada pela redução do débito cardíaco (17.4 ± 7.5 e 31.6 ± 6.3 mL/min grupo CLP 6 h e controle, respectivamente e 12.4 ± 3.4 e 30.4 ± 4.4 mL/min grupo CLP 24 h e controle, respectivamente), do volume sistólico (54.1 ± 18.1 e 117.4 ± 19.7 μ L grupo CLP 6 h e controle, respectivamente e 44.8 ± 16.4 e 94.8 ± 6.4 μ L grupo CLP 24 h e controle, respectivamente) e do trabalho sistólico (4189.5 ± 1603.5 e 9056.4 ± 1295.3 mmHg* μ L grupo CLP 6 h e controle, respectivamente e 2560.8 ± 1001.7 mmHg* μ L e \pm grupo CLP 24 h e controle, respectivamente). Nas 72 horas e 15 dias após a indução à sepse os animais CLP tem seus parâmetros cardíacos basais indiferentes aos grupos

controle, indicando uma recuperação. 30 dias após a CLP, os sobreviventes, voltaram a apresenta insuficiência cardíaca do tipo sistólica, com diminuição do débito cardíaco ($20,8 \pm 5,0$ e $38,5 \pm 4,1$ mL/min grupo CLP 30 d e controle, respectivamente), do volume sistólico ($189,3 \pm 7,7$ e $226,6 \pm 12,0$ μ L grupo CLP 30 d e controle, respectivamente), da fração de ejeção ($37,1 \pm 4,6$ e $60,8 \pm 2,0\%$ grupo CLP 30 d e controle, respectivamente) e do trabalho sistólico (6481 ± 1252 e $10551 \pm 735,6$ mmHg* μ L grupo CLP 30 d e controle, respectivamente) e também, do tipo diastólica caracterizada pelo aumento da pressão diastólica final (14.5 ± 8.2 e 2.8 ± 5.0 mmHg grupo CLP 30 d e controle, respectivamente) e do TAU ($14,0 \pm 0,6$ e $9,2 \pm 0,8$ G;ms grupo CLP 30 d e controle, respectivamente). Além das disfunções cardíacas observou-se um desequilíbrio entre os agentes antioxidantes e oxidativos nos sobreviventes à sepse, representados pela redução das atividades de SOD e GST (64% e 23%, respectivamente) e aumento significativo nos níveis de GSH, MPO e NAG (54%, 400% e 50%, respectivamente). Uma redução na resposta à dobutamina também foi encontrada. Apresentamos resultados inéditos acerca dos efeitos da sepse a longo prazo, ou seja, nos sobreviventes, onde observamos que as disfunções cardíacas reaparecem. Esses dados poderão colaborar para pesquisas posteriores, com foco na prevenção e melhora da função cardíaca, e, assim, proporcionar uma melhor qualidade de vida aos sobreviventes.

Palavras-chave: Sobreviventes à sepse. Insuficiência cardíaca. Sepse. Choque séptico. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Sepsis is a disease with high morbidity and mortality, resulted from an infectious process responsible for promoting an uncompensated systemic inflammatory response, which contributes to several organic dysfunctions. Among the dysfunctions caused by sepsis, we highlight systolic and diastolic heart failure. Despite the severity of this disease, many patients survive, recover and reach hospital discharge. However, sepsis survivors have a substantial increase in health needs, with cardiovascular events being an important cause of increased mortality and rehospitalization. There are few publications that address the topic of sepsis survivors. Therefore, this study aims to describe the main cardiac changes resulted from sepsis, induced by the cecal ligation and perforation model, in surviving animals. In order to do that, Wistar rats, submitted to CLP, were used at 6 and 24 hours (considered the acute phase), 72 hours and 15 days (considered the apparent recovery phase) and 30 days (considered sepsis survivors), where cardiac parameters were assessed using the intraventricular cardiac catheterization technique and isolated heart. In addition to assessments of baseline parameters, cardiac responses to phenylephrine and dobutamine agents, and changes in the ROS system, were also evaluated. In the acute phase, CLP groups presented arterial hypotension, high score for sepsis and systolic heart failure, characterized by reduction in cardiac output (17.4 ± 7.5 and 31.6 ± 6.3 mL / min in CLP 6 h and control group, respectively and 12.4 ± 3.4 and 30.4 ± 4.4 mL / min in CLP 24 h and control group, respectively), stroke volume (54.1 ± 18.1 and 117.4 ± 19.7 μ L CLP 6 h and control group, respectively and 44.8 ± 16.4 and 94.8 ± 6.4 μ L CLP 24 h and control group, respectively) and systolic work (4189.5 ± 1603.5 and 9056.4 ± 1295.3 mmHg * μ L CLP 6 h and control group, respectively and 2560.8 ± 1001.7 mmHg * μ L and \pm CLP 24 h and control group, respectively). 72 hours and 15 days after CLP animals have their baseline cardiac parameters indifferent to the control groups indicating a recovery. 30 days after CLP, the survivors returned to show systolic heart failure, with decreased cardiac output (20.8 ± 5.0 and 38.5 ± 4.1 mL / min in the CLP 30 d and control group, respectively) , stroke volume (189.3 ± 7.7 and 226.6 ± 12.0 μ L CLP 30 d and control group, respectively), ejection fraction (37.1 ± 4.6 and 60.8 ± 2.0 % CLP 30 d and control group, respectively) and systolic work (6481 ± 1252 and 10551 ± 735.6 mmHg * μ L CLP 30 d and control group, respectively) and also, of diastolic

heart failure characterized by increased final diastolic pressure (14.5 ± 8.2 and 2.8 ± 5.0 mmHg CLP 30 d and control group, respectively) and TAU (14.0 ± 0.6 and 9.2 ± 0.8 G; ms CLP 30 d and control group, respectively). In addition to the cardiac dysfunction, there was an imbalance between antioxidant and oxidative agents in sepsis survivors, represented by a reduction in SOD and GST (64% and 23%, respectively) and a significant increase in GSH, MPO and NAG levels (54%, 400% and 50%, respectively). A reduction in the response to dobutamine was also found. We have presented unprecedented results about the long-term effects of sepsis, which is, in survivors, the cardiac dysfunctions reappear. These data may collaborate for further research, with a focus on prevention and improvement of cardiac function, and thus provide a better quality of life for survivors.

Keywords: Sepsis survivors. Heart Failure. Sepsis. SOFA. Septic shock. Reactive oxygen species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo apresentando a depressão miocárdica provocada pela sepse, suas consequências e incidências.....	32
Figura 2 - Linha temporal contendo os principais pesquisadores, suas nacionalidades e contribuições na área da fisiologia e estudo da função cardíaca.....	37
Figura 3 – Esquema correspondente ao Desenho Experimental.....	50
Figura 4 - Representação esquemática do modelo para indução à sepse através da ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	52
Figura 5 - Representação gráfica da posição do cateter pressão volume durante a avaliação in vivo da função cardíaca.....	55
Figura 6 - Parâmetros hemodinâmicos avaliados a partir da curva P-V.....	57
Figura 7 - Curva de sobrevivência dos animais submetidos ao modelo de CLP.....	63
Figura 8 – Perfil das alterações sistêmicas provocadas pela indução à sepse através do modelo de CLP.....	66
Figura 9 – Caracterização do prejuízo no bombeamento cardíaco durante a sepse...69	
Figura 10 - Alterações cardíacas durante a fase sistólica.....	70
Figura 11 - Alterações cardíacas durante a fase diastólica.....	71
Figura 12 - Alterações de pressão e volume intraventricular em animais sobreviventes à sepse.....	73
Figura 13 - Alterações cardíacas de animais sobreviventes à sepse pela metodologia de langendorff.....	75
Figura 14 - Hiporresponsividade para a dobutamina em corações de animais sobreviventes à sepse.....	76
Figura 15 - Participação de agentes oxidante e anti-oxidantes no processo de insuficiência cardíaca em animais sobreviventes à sepse.....	81
Figura 16 - Alterações no peso seco e molhado de corações e pulmões de animais induzidos à sepse; da fase aguda à sobrevivência.....	82
Figura 17 - Alterações cardíacas encontradas nos sobreviventes à sepse.....	104
Figura 18 - Efeitos da fenilefrina na pressão arterial média de animais sobreviventes à sepse.....	122

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Ferramenta utilizada para avaliação dos sinais de sepse em animais submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco.....	53
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Perfil hematológico dos animais sobreviventes à sepse.....	67
Tabela 02 - Insuficiência cardíaca do tipo sistólica e diastólica encontradas nos animais sobreviventes à sepse 30 dias após a CLP.....	72
Tabela 03 – Delta dos efeitos da dobutamina sobre a bomba cardíaca.....	78
Tabela 04 – Delta das alterações pressóricas após a utilização de fenilefrina.....	80
Tabela 05 - Função da bomba cardíaca de animais sobreviventes à sepse antes e após a utilização de drogas vasoativas.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C – Antes de Cristo

BPM – Batimentos por minuto

BHT – Butilhidroxitolueno

BSA – Albumina sérica bovina

CLP – Ligadura e perfuração do ceco

CLP 6 h – Animais sépticos 6 horas após a cirurgia

CLP 24 h – Animais sépticos 24 horas após a cirurgia

CLP 48 h – Animais sépticos 48 horas após a cirurgia

CLP 72 h – Animais sépticos 72 horas após a cirurgia

CLP 15 d – Animais sépticos 15 dias após a cirurgia

CLP 30 d – Animais sépticos 30 dias após a cirurgia

DC – Débito cardíaco

DTNB – Ácido ditionitrobenzóico

dP/dt_{max} – Derivação da pressão pela derivação do tempo máximo

dP/dt_{min} – Derivação da pressão pela derivação do tempo mínimo

dV/dt_{max} – Derivação do volume pela derivação do tempo máximo

dV/dt_{min} – Derivação do volume pela derivação do tempo mínimo

EA – Elastância arterial

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FC – Frequência cardíaca

FEVE – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

FE – Fração de ejeção

GSH – Glutathiona

GST – Glutathione S-transferase

LOOH – Hiperóxidos lipídicos

MPO – Mieloperoxidase

NAG – N-acetil-glucosamina

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

PSF – Pressão sistólica final

PDI – Pressão diastólica inicial

Phe – Fenilefrina

P-V – Pressão volume

P_{\min} – Pressão intraventricular mínima

P_{mean} – Pressão intraventricular média

P_{dev} – Volume pressão diastólica final

P_{es} – Pressão sistólica final

$P@dV/dV_{\text{max}}$ - Pressão na derivação do volume pela derivação do tempo máximo

$P@dV/dV_{\text{min}}$ - Pressão na derivação do volume pela derivação do tempo mínimo

SOFA – Avaliação sequencial de falência orgânica

SOFAq – Avaliação sequencial rápida de falência orgânica

SOD – Superóxido dismutase

TAU – Tempo de relaxamento isovolumétrico

TS – Trabalho sistólico

TCI – Tempo de contração isovolumétrica

TE – Tempo de ejeção

TRI – Tempo de relaxamento isovolumétrico

TS – Trabalho sistólico

VS – Volume sistólico

VDFVE – Volume diastólico final do ventrículo esquerdo

VSVE – Volume sistólico do ventrículo esquerdo

VSFVE – Volume sistólico final do ventrículo esquerdo

V_{MAX} – Volume máximo intraventricular

V_{MIN} – Volume mínimo intraventricular

V_{es} – Volume sistólico Final

$V@dp/dtmax$ - Volume na derivação da pressão pela derivação do tempo máximo

$V@dp/dtmin$ - Volume na derivação da pressão pela derivação do tempo mínimo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 SEPSE.....	21
1.1.1 Contextualização histórica da sepse.....	21
1.1.2 Disfunções orgânicas decorrentes da sepse.....	25
1.1.3 Principais disfunções cardíacas e hemodinâmicas decorrentes da sepse.....	29
1.2 AVALIAÇÃO CARDÍACA EM MODELOS EXPERIMENTAIS.....	33
1.2.1 Breve contexto histórico sobre os estudos para avaliação do coração....	33
1.3 PRINCIPAIS PARÂMETROS CARDÍACOS PARA AVALIAÇÃO DA BOMBA CARDÍACA.....	38
1.3.1 O débito cardíaco.....	39
1.3.2 Fração de ejeção.....	40
1.3.3 Volume sistólico.....	41
1.3.4 Pressão diastólica final	41
1.3.5 Índice de relaxamento isovolumétrico.....	42
1.3.6 Trabalho sistólico.....	42
1.4 OS SOBREVIVENTES À SEPSE.....	43
1.5 CONTEXTUALIAÇÃO DO PROBLEMA.....	45
2. OBJETIVO.....	47
2.1 OBJETIVO GERAL.....	47
2.1.1 Objetivos específicos.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 ANIMAIS.....	48
3.2 SOLUÇÕES, DROGAS E REAGENTES.....	48
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	49
3.4 PROTOCOLOS ANESTÉSICOS.....	49
3.5 INDUÇÃO DA SEPSE PELO MODELO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP – CECAL LIGATION AND PUNCTURE).....	51
3.6 CARACTERIZAÇÃO DA SEPSE GERADA PELO MODELO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO.....	52
3.7 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	54

3.8 ANÁLISE IN VIVO DA FUNÇÃO CARDÍACA PELO MODELO DE CATETER DE PRESSÃO E VOLUME.....	54
3.9 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA EM CORAÇÃO ISOLADO E PERFUNDIDO UTILIZANDO O MÉTODO DE LANGENDORFF.....	56
3.10 PROPORÇÃO DE MASSA TECIDUAL PELO PESO CORPORAL.....	58
3.11 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE OXIDATIVA EM TECIDO CARDÍACO DE ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE.....	59
3.11.1 Glutationa reduzida (GSH)	59
3.11.2 Mieloperoxidase (MPO)	60
3.11.3 N-acetil-glucosamina (NAG)	60
3.11.4 Superóxido dismutase (SOD)	60
3.11.5 Glutationa S-transferase (GST)	61
3.11.6 Hidroperóxidos lipídicos (LOOH)	61
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
4 RESULTADOS	63
4.1. PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO – (CLP).....	63
4.2 PERFIL HEMATOLÓGICO: FASE DE RECUPERAÇÃO À SOBREVIVÊNCIA...65	
4.3 EFEITOS DA INDUÇÃO SÉPTICA NA FUNÇÃO DE BOMBEAMENTO DO CORAÇÃO: DA FASE INICIAL À SOBREVIVÊNCIA.....	68
4.4 CONTRATILIDADE REDUZIDA EM CORAÇÕES DE RATOS SOBREVIVENTES À SEPSE SUBMETIDOS AO MODELO DE LANGENDORFF.....	75
4.5 REDUÇÃO DAS RESPOSTAS CARDÍACAS ÀS DROGAS VASOATIVAS IN VIVO E IN VITRO.....	74
4.6 PARTICIPAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NAS INSUFICIÊNCIAS CARDÍACAS NOS SOBREVIVENTES À SEPSE.....	81
4.7 PESO SECO E MOLHADO DOS CORAÇÕES E PULMÕES COLETADOS DE ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE.....	82
5 DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÃO	103
7 REFERÊNCIAS	105
8 APÊNDICE A	118
9 APÊNDICE B	122

1 INTRODUÇÃO

1.1. SEPSE

1.1.1. Contextualização histórica da sepse

Nos tempos primitivos ouvíamos falar sobre a sepse como uma doença punitiva enviada pelos deuses, ou ainda bruxaria de povos inimigos, possessões demoníacas e até mesmo perda da alma pelas ações pecaminosas. Esses conceitos arcaicos mudaram a partir do século V a.C. com os estudos promissores de Hipócrates que acreditava que as doenças eram processos naturais e se acompanhadas de perto poderiam ser mais bem descritas (SILVA & VELASCO, 2007). Muito antes da era cristã, Homero, em seus poemas, cita pela primeira vez o termo sepse, originado do grego *sêpsis*, que significa putrefação (INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2016).

Ao longo do tempo, com a inserção do conceito de doenças de Hipócrates, as pesquisas acerca das doenças se encontraram com as da microbiologia, tornando possível descobertas que iam desde a invenção de ferramentas diagnósticas ao desenvolvimento de ferramentas farmacológicas para o tratamento dessas doenças. Alguns marcos históricos podem ser destacados nas bibliografias de Silva & Velasco, (2007) e Instituto Latino Americano da Sepse (2016): de forma temporal, vamos trazer alguns marcos históricos sobre o surgimento do conceito de sepse no mundo.

1346 a 1353 – um dos exemplos mais ilustrativos do impacto da sepse foi a pandemia provocada pela peste negra (bactéria *yersinia pestis sp*) a qual, na sua forma septicêmica, dizimou aproximadamente um terço da população europeia;

1609 – os estudos de microrganismos ganharam celeridade a partir da descoberta de Galileu, quem construiu o primeiro microscópio;

1683 – o que hoje conhecemos como bactérias foram identificadas, nessa época, por Anton Van Leeuwenhoek como os animáculos;

1840 – Friedrich Gustav e Jakob Henle foram os primeiros a descrever que os microrganismos eram causadores de doenças;

1861 e 1866 – nesse período, Louis Pasteur renegou a teoria da geração espontânea e destacou os seus estudos sustentando a teoria de que os germes eram causadores de doenças (teoria da biogênese, descrita por Rudolf Virchow em 1859);

1880 – após a descoberta de que alguns microrganismos geravam doenças, o cientista Elie Metchnikoff descreveu que o processo fagocitário encontrado nesse tipo de infecção estava relacionado com o processo inflamatório iniciado pelo patógeno;

1882 – o cientista Koch foi o primeiro a isolar as bactérias causadoras da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) e anthrax (*Bacillus anthracis*) e demonstrou a origem infecciosa dessas doenças;

1885 – James Carroll provou que a febre amarela era causada por um vírus e demonstrou, pela primeira vez, que os vírus são capazes de causar doenças em humanos;

1908 – os cientistas Elie Metchnikoff e Paul Ehrlich ganharam o Prêmio Nobel com o conhecimento descrito acerca dos processos inflamatórios decorrentes da infecção bacteriana;

1909 – Paul Ehrlich desenvolveu a droga salvarsan para o tratamento de sífilis, doença infectocontagiosa de origem bacteriana, que dizimou milhares de europeus durante séculos;

1944 – Oswald Avery demonstrou a existência da transferência do DNA de formas virulentas de *Streptococcus pneumoniae* para formas avirulentas, fazendo com que essas últimas adquirissem fenótipos patogênicos. Essa descoberta foi de extrema importância para os geneticistas que passaram a crer que os genes eram compostos por DNA;

1990 – neste ano, foi descrita a hipótese de que durante a sepse há uma resposta inflamatória maciça e compensatória, a qual teria papel importante nos desfechos sistêmicos causados pela doença;

1992 – dando destaque à doença infecciosa de ação sistêmica, causada por uma resposta inflamatória não organizada, pesquisadores se encontram para realizarem a primeira conferência para consenso e definições

de sepse, onde foram descritas as definições de síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, sepse grave e choque séptico;

1994 – o diagnóstico clínico para sepse foi otimizado a partir do desenvolvimento da ferramenta de avaliação sequencial de disfunções orgânicas (traduzido do inglês *sequential organ failure assessment* - SOFA) dando celeridade ao tratamento;

2001 – ocorreu a segunda conferência para consenso e definições de sepse, desta vez, foi estabelecido um consenso sobre os sinais e sintomas comumente encontrados em pacientes sépticos;

2016 – a SCCM (*Society of Intensive Care Medicine*) e a ESICM (*European Society of Intensive Care Medicine*) publicaram as novas definições para sepse, que passou a ser definida pela presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária a resposta desregulada do hospedeiro em razão de uma infecção e assim os critérios de SIRS passam a não ser mais requeridos para o diagnóstico de sepse;

2016 – a expressão “sepse grave” foi extinta, simplificando a nomenclatura; o diagnóstico de sepse passou a ser restrito aos pacientes já com disfunção orgânica;

2016 – surgiu o novo score para diagnóstico de sepse derivado do SOFA o *quick* SOFA, utilizado principalmente para diagnóstico rápido em unidades hospitalares de urgência e emergência.

Durante a terceira conferência internacional para definição de sepse e choque séptico, publicada em 2016, e com o endosso da Sociedade Europeia de Medicina Intensiva e da Sociedade de Medicina Intensiva, a sepse passou a ser definida como uma resposta disfuncional do hospedeiro, o qual apresenta sinais importante, associada à infecção e choque séptico e representando um alto risco de vida. Esta nova definição baseia-se em um instrumento que associa dados clínicos e biológicos e que podem identificar prontamente os pacientes sépticos na beira do leito (SINGER *et al.*, 2016; VERDONK, BLET e MEBAZAA, 2017).

O SOFA (avaliação sequencial de falência orgânica) e o SOFAq (avaliação sequencial rápida de falência orgânica) são instrumentos aprovados e utilizados para o diagnóstico de pacientes sépticos, a partir de variáveis clínicas e bioquímicas, tais como: i. frequência respiratória; ii. nível de

consciência avaliado a partir da aplicação da escala de Glasgow; iii. pressão arterial média (PAM); iv. relação entre pressão arterial de oxigênio pela fração inspirada de oxigênio; v. creatinina sérica depurada; vi. bilirrubina; vii. contagem de plaquetas e viii. necessidade de drogas vasopressoras para manter a PAM. Quando encontradas mais de duas disfunções durante a aplicação da escala de SOFA, somado à suspeita de infecção, o paciente é diagnosticado como séptico, e caso o mesmo apresente resistência a agentes vasopressores para manter uma PAM ≥ 65 mmHg e níveis de lactato sérico > 2 nmol/L, diagnostica-se, assim, o estado de choque séptico (SINGER *et al.*, 2016; VERDONK, LET e MEBAZAA, 2017).

Quanto aos fatores epidemiológicos relacionados à doença foi possível observar dados expressivos acerca de sua gravidade. Um exemplo é o estudo realizado pelo Instituto Latino-americano de Sepse – Instituto Latino Americano da Sepse (2016); no qual demonstra que entre os anos de 2004–2015, em unidades de terapia intensiva (UTIs) no Brasil, a taxa de mortalidade entre os pacientes diagnosticados com sepse foi de 30,8% enquanto que no choque séptico foi de 64,3%.

A sepse é uma doença com elevadas taxas de morbidades e mortalidade entre os pacientes hospitalizados e é moldada por fatores diversos, que envolvem desde o patógeno até as características do hospedeiro como, por exemplo, sexo, raça, idade e meio ambiente (SINGER *et al.*, 2016, ALMEIDA *et al.*, 2013).

Segundo a pesquisa do Instituto Latino Americano da Sepse (2016), a letalidade global da sepse, atualmente, é de 46%, sendo maior em instituições públicas de saúde (58,5%). No Brasil, sua letalidade em serviços de urgência e emergência, de rede pública, chega a ser 58,7% contra, 27,5% nas redes privadas. As razões para essa discrepância numérica podem estar relacionadas à carência de leitos de terapia intensiva na rede pública de saúde, associado ao desconhecimento entre os profissionais de saúde, principalmente médicos e enfermeiros, sobre os sinais de alerta de gravidades associados a quadros infecciosos.

Apesar da gama de estudos decorrentes desde a década de 90, quando já se relacionava a sepse com uma resposta inflamatória sistêmica

exacerbada, o entendimento das razões pelas quais essa doença causa alta taxa de mortalidade, ainda não é completo. Isso nos leva a acreditar na importância de investir e estimular pesquisas acerca dos processos fisiopatológicos da sepse e, então, novas propostas terapêuticas.

1.1.2. Disfunções orgânicas decorrentes da sepse

A sepse é resultado de uma interação complexa entre o microrganismo infectante, o sistema imune, componentes da cascata de coagulação, ativação de receptores do tipo *toll*, produção e liberação maciça de citocinas pró-inflamatórias, que tem sido abordado de forma sistemática por diversos autores (por exemplo, COEHN, 2002; FRY, 2012; SINGER et al., 2016; LEVY, EVANS e RHODES, 2018). Embora toda a progressão fisiopatológica decorrente da sepse, assim como sua alta mortalidade, tenham sido originalmente atribuídas à infecção sistêmica causada por diferentes microrganismos, hoje é bem reconhecido que a complexidade e gravidade da sepse decorrem do processo inflamatório sistêmico intenso que, em muitos casos, não é reversível pelo uso de anti-inflamatórios, sejam eles esteroidais ou não esteroidais (Hotchkiss & Karl, 2003).

É necessário destacar que essa reação inflamatória exacerbada contribui para a instalação de déficits funcionais em diversos sistemas orgânicos e isso ocorre em especial pela elevada quantidade de mediadores químicos liberados durante a doença. Podemos exemplificar esta relação entre mediadores químicos e o progresso da doença, utilizando a já descrita liberação e produção excessiva de óxido nítrico durante a sepse onde a isoforma induzida da enzima que o produz, a NO sintase induzida (iNOS ou NOS-2), contribui para a instalação de um quadro de hipotensão severa (ex. REES et al., 1990), associado a um déficit na função cardíaca (JARDIN et al., 1999) culminando em um estado de hipoperfusão sanguínea prolongada e falência múltipla de órgãos. Em última instância, essa falência é a principal causa de morte ocasionada pelo choque séptico, reforçando a ideia de que as disfunções orgânicas estão fortemente ligadas à instalação do processo inflamatório.

Seguindo nosso diálogo sobre as alterações orgânicas, dentro do sistema nervoso, as encefalopatias são uma das complicações mais comuns da sepse, isso porque durante a sepse encontramos respostas imunes e inflamatórias exacerbadas que comprometem a microcirculação cerebral, gerando sinais e sintomas que podem ser reconhecidos por confusão mental, desorientação, irritabilidade, agitação e coma, o que a longo prazo podem acarretar alterações neurocognitivas (STECKERT *et al.*, 2014). O estudo de Fang *et al.*, (2011) analisou prontuários em unidades hospitalares a fim de localizar pacientes com histórico de sepse, com foco no sistema nervoso central e observou que esses pacientes poderiam apresentar aumento da probabilidade de evolução para esclerose lateral amiotrófica (ELA) pela sua passagem por um quadro séptico com foco neurológico.

Dados epidemiológicos revelam que cerca de 70% dos pacientes com sepse apresentam sintomas neurológicos que variam de letargia a coma e mais de 80% apresentam anomalias no exame de eletroencefalograma, tornando-os mais suscetíveis a alterações neurológicas, quando comparados com pacientes que não apresentaram quadro infeccioso compatível com a sepse (MODI *et al.*, 2012). A mortalidade das encefalopatias relacionadas à sepse se correlaciona com os distúrbios neurológicos avaliados pela escala de coma de Glasgow, ou seja, quanto maior o comprometimento neurológico, maior o risco à vida (ZHANG *et al.*, 2012).

Além da escala de Glasgow, aplicada durante a internação em unidade de terapia intensiva, os escores elevados na escala de fisiologia aguda e avaliação crônica da saúde (APACHE II) estão correlacionados a um grau maior de perturbação da consciência, mostrando que o monitoramento regular da consciência durante o curso da doença se faz essencial para prevenir futuras lesões neurológicas cognitivas irreversíveis (FANG *et al.*, 2011). Apesar da eficácia da escala de APACHE II, a avaliação neurológica, realizada durante a aplicação do SOFA, é feita pela aplicação da escala de coma de Glasgow e vem sendo reavaliada em alguns estudos pela variabilidade significativa dos valores registrados, uma vez que são aplicadas em diferentes momentos durante a internação (TALLGREN, BACKLUND, HYNNINEN, 2009; LAMBDEN, 2019).

Outro sistema bastante prejudicado é o respiratório onde a sepse provoca uma das consequências mais graves da disfunção pulmonar, a queda da pressão arterial parcial de oxigênio e hipoxemia tecidual. Clinicamente, durante esse processo, pode ser observada a hiperventilação compensatória do paciente, acarretando aumento da eliminação de dióxido de carbono, com conseqüente aumento do pH sanguíneo, ou seja, uma alcalose respiratória (LELUBRE & VICENT, 2018).

A taquipneia parece ser um dos únicos sinais clínicos da alcalose respiratória, em razão da hipoperfusão do tecido cerebral e cardíaco, alguns pacientes podem apresentar arritmias, distúrbios neurológicos (p.ex. confusão mental), distúrbios motores (p.ex. fraqueza muscular) e distúrbios renais (p.ex. poliúria) (JOHNSON, 2016). A escala de SOFA permite fazer a avaliação respiratória através do monitoramento não invasivo (p.ex. frequência respiratória) e/ou invasivo através da pressão parcial de oxigênio arterial, seguido do cálculo da fração de PaO_2/FiO_2 , que além de avaliar o comprometimento da função respiratória, orienta para administração de oxigênio conforme a necessidade do paciente (LAMB DEN *et al.*, 2019).

A disfunção renal também está presente em pacientes com diagnóstico de sepse e leva à mortalidade em torno de 70%, sendo então, um preditivo para alta letalidade da sepse nas unidades de terapia intensiva (KLENZAK & HIMMELFARB, 2005). A insuficiência renal aguda (IRA) se faz presente, clinicamente, através da diminuição do volume urinário (oligúria), geralmente secundária ao choque séptico e também relacionada ao estado hipovolêmico comum nesta condição patológica. Imagina-se que as alterações histológicas na morfologia glomerular estejam ligadas aos efeitos hemodinâmicos renais, provocados pela hiporreatividade vascular (BOFFA & ARENDOSHORST, 2004; LELUBRE & VICENT, 2018).

Ao longo do choque séptico ocorrem danos renais que poderiam justificar a IRA, entre elas, destacamos a evidência de necrose tubular aguda e diminuição da resistência vascular renal ligados ao aumento da liberação de óxido nítrico induzido pela atividade da cascata inflamatória nas células endoteliais da vasculatura renal (REGUEIRA *et al.*, 2011). Além das causas hemodinâmicas, outros mecanismos parecem contribuir para a IRA durante a sepse, tais como a liberação das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF-

α), aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (p.ex. o peroxinitrito capaz de gerar danos no DNA das células) e a diminuição da atividade antioxidante (REGUEIRA *et al.*, 2011; PLOTNIKOV *et al.*, 2019).

O principal componente renal avaliado pelo SOFA é baseado nos índices clínicos de creatinina sérica ou débito urinário, os quais possuem algumas limitações já que o aumento da creatinina plasmática é um fenômeno tardio que para ocorrer depende de uma grande diminuição da capacidade de filtração glomerular e as alterações do débito urinário são afetadas pelo volume de sangue do paciente, reposições volêmicas e o uso de agentes diuréticos (REGUEIRA *et al.*, 2011; LAMBDEN *et al.*, 2019).

Alterações hepáticas, mesmo na ausência de anormalidade hepatobiliares, também são comuns durante a sepse, e geralmente estão relacionadas aos efeitos deletérios de patógenos, toxinas ou até mesmo citocinas (pró e anti-inflamatórias), sendo representadas analiticamente pelo aumento dos níveis de bilirrubinas e transaminases séricas (LELUBRE & VICENT, 2018). No decorrer do choque séptico a resposta inflamatória exacerbada altera o metabolismo de células hepáticas induzindo apoptose e estimulando a liberação de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico, pelas células de Kupffer (macrófagos hepáticos), o que induz às lesões no endotélio e nos hepatócitos (WOZNICA *et al.*, 2018).

As coagulopatias frequentemente são observadas durante a sepse. No período inicial destaca-se um tempo de coagulação prolongado e um número reduzido de plaquetas e sua principal causa está relacionada às lesões endoteliais, que resultam em um desbalanço entre a fibrinólise e a coagulação (WOZNICA *et al.*, 2018). Outros achados comuns das alterações hematológicas durante a sepse incluem níveis elevados de D dímero, e no seu prognóstico mais negativo, a presença de coagulação intravascular disseminada, caracterizada por formação de trombose generalizada em vasos de pequeno, médio e grande calibre, associados com hemorragias simultâneas em diversos locais (WOZNICA *et al.*, 2018; LELUBRE & VICENT, 2018). Acreditamos que a avaliação orgânica durante a sepse nos guia para as propostas terapêuticas de forma mais assertiva, proporcionando um tratamento direcionado e individualizado.

1.1.3. Principais disfunções cardíacas e hemodinâmicas decorrentes da sepse

Durante a sepse, o sistema cardiovascular é um dos mais afetados, caracterizado principalmente por hipotensão arterial e depressão da função cardíaca (PARKER *et al.*, 1984; BONE, 1991). O artigo de Annane *et al.*, (2007), e o estudo de Barros, Maia e Monteiro (2016), mostram que a mortalidade é cerca de 30% maior em pacientes que desenvolveram lesões cardíacas decorrentes do processo séptico, quando comparados com os que não desenvolveram, enfatizando a sua potencial letalidade. Desde 1984 estudos vêm caracterizando a disfunção cardíaca como um fator central na sepse e choque séptico. Apesar de não ser uma entidade clínica única, apresenta amplo espectro de síndromes com uma infinidade de aspectos fisiopatológicos, distúrbios metabólicos, microvasculares, funcionais e anatômicos (PARKER *et al.*, 1984; KUMAR *et al.*, 1996; VIELLARD-BARON *et al.*, 2014).

Diversos estudos trazem a sepse dividida em duas fase, na sua fase inicial, a sepse traz alterações circulatórias relacionadas principalmente com a perda do volume intravascular, que resulta no enchimento insuficiente do coração, tendo como consequência uma compensação cardíaca, aumento da frequência e do débito cardíaco e a redução da resistência vascular periférica, caracterizando a fase hiperdinâmica. A progressão da doença leva a uma segunda fase, a hipodinâmica, com diminuição do desempenho cardíaco, resultante da redução do débito cardíaco e da hipotensão associada à refratariedade aos agentes vasoconstritores (CLOWES *et al.*, 1966; BONE, 1991; WU, TANG e LIU, 1997; BELCHER, MITCHELL e EVANS, 2002; e ASSREUY. 2006).

Sendo um componente central do sistema cardiovascular, o coração acaba por sofrer perturbações diretas do sistema vascular periférico, causando alterações na pré-carga e pós-carga que, a longo prazo, causarão lesões irreversíveis ao miocárdio pela sobrecarga cardíaca. A fisiopatologia dessas disfunções durante a sepse podem ser compreendidas pelas mais diversas causas, sendo elas genéticas, moleculares, metabólicas e estruturais, mecanismos altamente complexos que tornam a elucidação desse problema

distante de ser concluída (FENTON & PARKER, 2016). A partir deste ponto passaremos a dissertar sobre alguns mediadores e sistemas envolvidos neste distúrbio hemodinâmico embora, não tenham sido objeto do nosso estudo, vimos como importante estes conceitos.

Em modelos animais observa-se que uma deficiência na expressão da óxido nítrico sintase induzida parece exercer um componente cardioprotetor, sugerindo que a iNOS está envolvida diretamente nas lesões cardíacas através da vasodilatação disseminada, que culmina em alterações na pré e pós-carga ventricular, diminui o fluxo coronariano e assim reduz a perfusão miocárdica causando alterações estruturais capazes de prejudicar sua mecânica contrátil, o que resulta em baixo débito cardíaco (FENTON & PARKER, 2016; LAMBDEN *et al.*, 2019).

Os cardiomiócitos têm a sua função contrátil prejudicada na fase inicial da sepse, através de células da imunidade inata, com a ativação dos receptores do tipo toll (BROWN & JONES, 2004). Estudos realizados em animais não humanos mostram que após o reconhecimento do patógeno, os cardiomiócitos passam a expressar altos níveis de moléculas de adesão celular; secretam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que iniciam o processo inflamatório local e recrutam células inflamatórias; e ainda expressam moléculas reguladoras de cálcio que diminuem a concentração de cálcio intracelular, interferindo no acoplamento excitação-contração e, por consequência, geram deficiência contrátil (GODDARD *et al.*, 1996; MASSEY *et al.*, 1995).

Um estudo de realizado com pacientes humanos em choque séptico, revelou que anormalidades estruturais têm participação importante na disfunção cardíaca originada da sepse, uma vez que há aumento nos níveis séricos de troponina-T e troponina-I cardíaca, possivelmente, por necrose e apoptose das células miocárdicas (AMMANN *et al.*, 2001). Em análises realizadas a partir da coleta de corações humanos, quando comparados com os controles, os corações sépticos apresentaram maior infiltrado de macrófagos, aumento da expressão de proteína TNF- α , maior acúmulo intracelular de gordura e maior ruptura dos filamentos de actina e miosina favorecendo para uma redução da funcionalidade cardíaca (ROSSI, CELES, PRADO e SAGGIORO, 2007).

O trabalho de Freitas *et al.*, (2016) avaliou camundongos C57 induzidos a sepse por meio do modelo de ligadura e perfuração do ceco e observou as modificações estruturais envolvidas no processo de insuficiência cardíaca, consequente da sepse. Este autor observou que o remodelamento cardíaco têm relação com o aumento da expressão da proteína ubiquitina e também a redução das proteínas contráteis actina e miosina e está aumentada durante a inibição da via mTOR no tecido cardíaco, reforçando que a sepse é capaz de modificar estruturalmente o coração e provocar lesões.

Essas alterações estruturais causam prejuízos na contratilidade cardíaca tanto no ventrículo esquerdo quanto no ventrículo direito. Estudos ecocardiográficos em pacientes sépticos mostram que tanto disfunções sistólicas quanto diastólicas ocorrem durante essa doença, sendo a diastólica mais associada ao alto índice de mortalidade (LANDESBURG *et al.*, 2012). A disfunção diastólica, quando no ventrículo esquerdo, resulta em taquicardia e dilatação da câmara ventricular, provoca o aumento do volume diastólico final do ventrículo esquerdo e contribui para o prejuízo no relaxamento durante a diástole (FENTON & PARKER, 2016).

Os prejuízos relacionados à pré-carga estão relacionadas à hipovolemia observada na progressão da doença, somando-se à má distribuição de volume. Quando avaliamos a pós-carga cardíaca, durante a sepse, observamos sua diminuição em humanos adultos, associados à redução da resistência vascular sistêmica provocada pela liberação de algumas citocinas, pela desregulação autonômica e pelas anormalidades na produção de óxido nítrico (VIELLARD-BARON *et al.*, 2014).

A Figura 1, modificada de Fenton & Parker (2016), apresenta um resumo acerca dos mecanismos da disfunção cardíaca durante a sepse, com a incidência de 100% para depressão do miocárdio, prevalecendo a disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (60%) corroborando com as informações abordadas acima.

Com a finalidade de restaurar o prejuízo hemodinâmico e cardiovascular provocado pela sepse, segundo Dellinger *et al.*, (2013), no documento referente ao suporte hemodinâmico e terapia adjuvante para o tratamento do choque séptico, recomenda-se inicialmente a administração de reposição volêmica, e caso a hipotensão não seja revertida é recomendado o

uso de vasoconstritores e inotrópicos com o objetivo de atingir a pressão arterial média (PAM) de 65 mm Hg. No entanto, essas recomendações são baseadas em baixos graus de evidência.

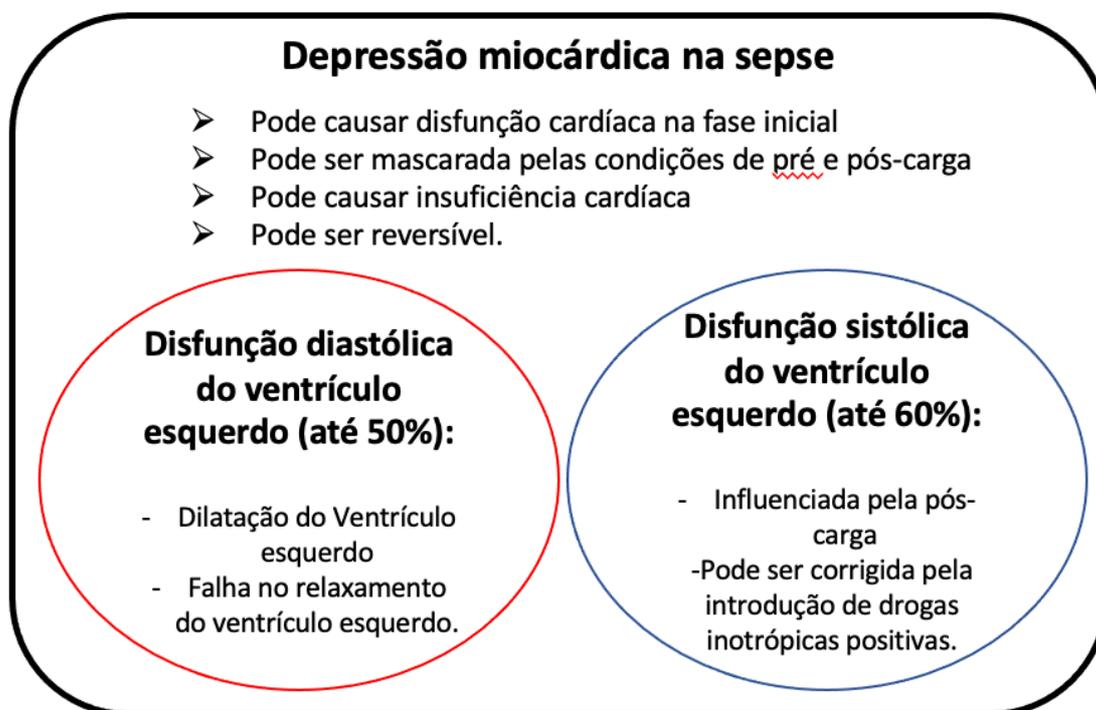


Figura 1: Esquema ilustrativo apresentando a depressão miocárdica provocada pela sepse, suas consequências e incidências. Observamos que um parcela significativa dos pacientes que entram em sepse apresentam depressão miocárdica do tipo sistólica (relacionadas a sua capacidade contrátil) ou de diastólica (relacionada a sua capacidade de relaxamento) Fonte: figura traduzida e adaptada de Fenton & Parker (2016).

Os mecanismos de ação, usos e efeitos obtidos pelos fármacos vasopressores e inotrópicos são bem conhecidos apenas em condições fisiológicas, seus benefícios e ações indesejadas sobre o sistema cardiovascular durante o choque séptico não são adequadamente conhecidos. Em nosso trabalho buscamos identificar a influência do uso dos agentes vasopressores sobre os parâmetros cardíacos e a resposta do coração a partir da utilização de agentes cardiotônicos, nas diferentes fases da sepse, oportunizando aos leitores uma visão funcional do coração em resposta a esses agentes farmacológicos.

O Instituto Latino Americano da Sepse (2016) afirma que as disfunções cardiovasculares estão diretamente relacionadas à indução exacerbada de mediadores inflamatórios e se caracterizam por redução da contratilidade cardíaca, hiporresponsividade vascular e queda do débito cardíaco. Estas

alterações não se fazem presentes apenas durante a sepse, mas parecem persistir nos que sobrevivem a ela, entretanto, pouco tem-se publicado acerca desses prejuízos, o que nos levou a tornar como objetivo principal desta pesquisa a descrição das alterações cardíacas observadas durante e após o processo séptico. A seguir, iremos discutir sobre as diferentes ferramentas, que foram surgindo ao longo dos séculos, e são capazes de avaliar o sistema cardiovascular.

1.2. AVALIAÇÃO CARDÍACA EM MODELOS EXPERIMENTAIS

1.5.6 Breve contexto histórico sobre os estudos para avaliação do coração

Pode-se dizer que a grande evolução dos estudos sobre fisiologia e anatomia humana tiveram início no século XIV, através da primeira necropsia documentada e sistematizada de Varignana em 1302. Após este documento, já no século XIX, inicia-se o primeiro método da ciência médica, o anátomo clínico, caracterizando o então denominado renascimento da medicina. Esse documento foi fundamental para o ensino da medicina, sendo a base para publicação do texto *Clinicopathological Conference (Case Records of the Massachusetts General Hospital)* disponíveis no Boston Medical and Surgical Journal, periódico escrito pelo médico e humanista Richard Clarck Cabot, publicado em 1924 (REIS, 1986; ROCHA, 2014).

Uma das primeiras grandes ferramentas desenvolvidas pela fisiologia experimental ocorreu em 1847, quando o fisiologista Karl Ludwig desenvolveu o quimógrafo, aparelho destinado ao registro gráfico de ondas de variação o qual possibilita a mensuração da pressão arterial (REIS, 1986; ARNOLD & KATZ, 1965). O surgimento do quimógrafo possibilitou a avaliação do sistema cardiovascular por meio da análise e estabelecimento de correlações entre pressão sanguínea, ritmo cardíaco e respostas nervosas, facilitando a compreensão da fisiologia humana (REIS, 1986; ARNOLD & KATZ, 1965; NOBRE, 2002).

Com a expansão do conhecimento teórico-científico, foi possível, em 1895, a descrição da primeira Lei da Mecânica de Contração Cardíaca,

desenvolvida por Frank, e anos mais tarde detalhada pelo grupo de Starling, conhecida até hoje como lei de Frank-Starling. Essa lei possibilitou o conhecimento da fisiologia cardíaca não só na ausência de doença como também na sua presença (STARLING, 1918). Frank possuiu cerca de 133 publicações com ênfase na mecânica cardíaca e métodos de medição, os quais se mostram bastante influentes no aprofundamento da compreensão da fisiologia cardiovascular até hoje (KUHTZ-BUSCHBECK et al., 2018).

Concomitantemente às descobertas supracitadas, conforme descrito por GIFFONI & TORRES (2009), em seu artigo sobre a história da medicina, o século XIX também vislumbrou o aparecimento da eletrofisiologia, com o físico italiano Carlos Matteucci que, em 1842, demonstrou a existência de uma corrente elétrica em cada contração cardíaca. Um ano após esses dados foram confirmados pelos estudos de Emil DuBois-Reymond, pesquisador fundador da eletrofisiologia, que em experimentos realizados em corações de sapos descreveu o potencial de ação. Entretanto, somente em 1856 o primeiro potencial de ação cardíaco foi registrado, em um experimento com rãs, pelos pesquisadores Rudolph Von Koelliker e Heinrich Muller.

Os autores Giffoni & Torres (2009) e Mesquita *et al.*, (2015) também relatam que o primeiro eletrocardiograma humano foi registrado por Waller em 1887, quando conectou eletrodos ao tórax e demonstrou que a cada batimento cardíaco havia uma oscilação elétrica, comprovando que cada contração cardíaca era precedida de uma atividade elétrica. Willem Enthoven, após observar que nos experimentos de Waller havia limitações de frequência, acrescentou recursos matemáticos e a implementação de galvômetro de corda chegando a um traçado real servindo de alicerce para o surgimento do eletrocardiograma em 1902, nos moldes que seguem sendo usados ainda nos dias atuais. A descoberta de Enthoven foi fundamental para a compreensão das arritmias por Thomas Lewis, que até então eram estudadas através da medida de impulsos produzidos pelos vasos.

O estudo da técnica para realização do cateterismo cardíaco, método utilizado para realizar estudos hemodinâmicos no coração, teve seu início no ano de 1711. Isso ocorreu a partir dos trabalhos de Stephen Hales e, posteriormente, no século XIX, com o fisiologista francês Claude Bernard que, com o intuito de testar a teoria de Lavoisier sobre a combustão orgânica gerada

primeiramente nos pulmões, desenvolveu longos cateteres de chumbo feitos para medir temperatura, e os inseriu no interior dos ventrículos de cavalos através da artéria jugular e carótida. Em 1929, Forssmann apresentou a ideia de inserir um cateter no coração humano ao seu chefe, o professor Schneider, que sugeriu manter a experimentação em animais (GOTTSCHALL, 2009).

Ainda, segundo relatos de Gottschall (2019) Forssmann conquistou a confiança da enfermeira Gerda Ditzen a ponto de a mesma oferecer-se como sua primeira paciente; o pesquisador fingiu aceitar mas amarrou Gerda na mesa cirúrgica, anestesiou sua própria fossa cubital esquerda e se cateterizou. Após o procedimento, Forssmann soltou Ditzen e solicitou que a mesma fosse buscar o raio-X. Foi então que o pesquisador se colocando atrás de um fluoroscópio e através de um espelho segurado por Ditzen acompanhou a progressão do cateter, realizando então, o primeiro cateterismo intracardíaco em humanos, conforme o registrado na revisão de Mesquita *et al.*, (2015).

Seguindo nossa linha histórica sobre os métodos utilizados para avaliação da fisiologia cardíaca, podemos destacar a pesquisa de Oscar Langendorff que estabeleceu, em 1897, uma preparação de coração isolado perfundido. Este método serviu para importantes descobertas, tais como o papel da temperatura, do oxigênio e dos íons de cálcio na função contrátil do coração, a origem da atividade elétrica cardíaca no átrio, o efeito cronotrópico negativo da estimulação do vago e demonstrou que o fornecimento de nutrientes necessários para manutenção da atividade cardíaca se dá por artérias intituladas coronárias e que essas são capazes de influenciar a função mecânica do coração (SKRZYPIEC-SPRING *et al.*, 2006).

A técnica de Langendorff foi aperfeiçoada ao longo dos anos e é utilizada até hoje por fisiologistas e farmacologistas para estudar os efeitos de diferentes drogas cardiovasculares na vasculatura coronariana, na contração muscular e frequência cardíaca. Esta técnica também é capaz de avaliar os efeitos de alterações gênicas e de doenças na fisiologia cardíaca, e assim, auxiliar na proposta de novas linhas terapêuticas para proteger o coração. (SKRZYPIEC-SPRING *et al.*, 2006).

No final do século XIX, a partir dos experimentos de Otto Frank, observamos os primeiros estudos relacionados aos parâmetros pressão-volume ventricular do coração de sapos. Posteriormente, nos anos 80, o

laboratório de Sagawa avançou com as pesquisas estabelecendo conceitos de que a contração ventricular se comporta como uma variável no tempo, examinando a relação sistólica final pressão-volume (ESPVR), o conjunto de pontos P-V de múltiplos ciclos cardíacos gerados sob diferentes condições de carga, capacidade elástica do coração, impedância aórtica, mudanças de pré e pós-carga e a forma de avaliar a eficiência energética miocárdica (CINGOLANI & KASS, 2011).

Em meados da década de 80, com a chegada de um cateter de condutância, foi possível realizar essas mesmas análises, e outras, *in vivo*, sincronizando o volume ventricular esquerdo aos demais parâmetros. No final da década de 80, o método de cateter foi aplicável em seres humanos e a análise P-V para doenças cardíacas passou a ser utilizada como diagnóstico. Embora hoje sua utilização seja pouco aplicável em humanos, por ser um procedimento invasivo, seu uso em animais é considerado padrão ouro para a análise funcional do ventrículo em diversas doenças cardíacas (CINGOLANI & KASS, 2011)

Já no século XX, o conceito de ultrassonografia por imagem foi descrito primeiramente em 1961 por Baum e Greenwood e utilizado para avaliação do coração por Dekker em 1974. Surge então, o método que se tornou até hoje um dos mais importantes para diagnosticar doenças cardiovasculares, e avaliar a anatomia e capacidade funcional do coração de maneira não invasiva, o ecocardiograma transtorácico. Após o desenvolvimento do ecocardiograma, foi introduzida na clínica a avaliação cardíaca pela utilização de um transdutor transesofágico controlado por micromanipuladores: o ecocardiograma transesofágico, sendo possível uma imagem mais detalhada já que não sofre interferência de estruturas como a caixa torácica e os pulmões (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

Várias descobertas científicas citadas ao longo deste trabalho foram contempladas com o prêmio Nobel, e contribuíram, direta ou indiretamente, para os avanços na fisiopatologia, diagnóstico e tratamento de doenças cardiovasculares. Entre os pesquisadores laureados com esse prêmio destacamos Willem Einthoven, ganhador do Nobel no ano de 1924, pela invenção do eletrocardiograma, e Werner Forssman, Andre Cournard e

Dickinson W. Richards, ganhadores do Nobel no ano de 1956 pela realização do cateterismo cardíaco.

No Brasil, a revisão publicada por Reis (1986), cita os estudiosos Büngueler, Jairo Ramos, Sylvio Carvalhal, Luigi Bragliolo e Annes Dias, das faculdades de medicina de São Paulo e Rio de Janeiro, como grandes destaques para a implantação do estudo anatomoclínico no ensino médico. Segundo esse autor, destaca-se a contribuição de Paulo José Ferreira Tucci, que atuou principalmente nos temas relacionados aos mecanismos de Frank-Starling, contratilidade cardíaca, desempenho ventricular, insuficiência e hipertrofia cardíaca, e os feitos de Eduardo Moacyr Krieger, o pioneiro na utilização de ratos como modelos para estudo de regulação da pressão arterial durante o sono e exercício físico.

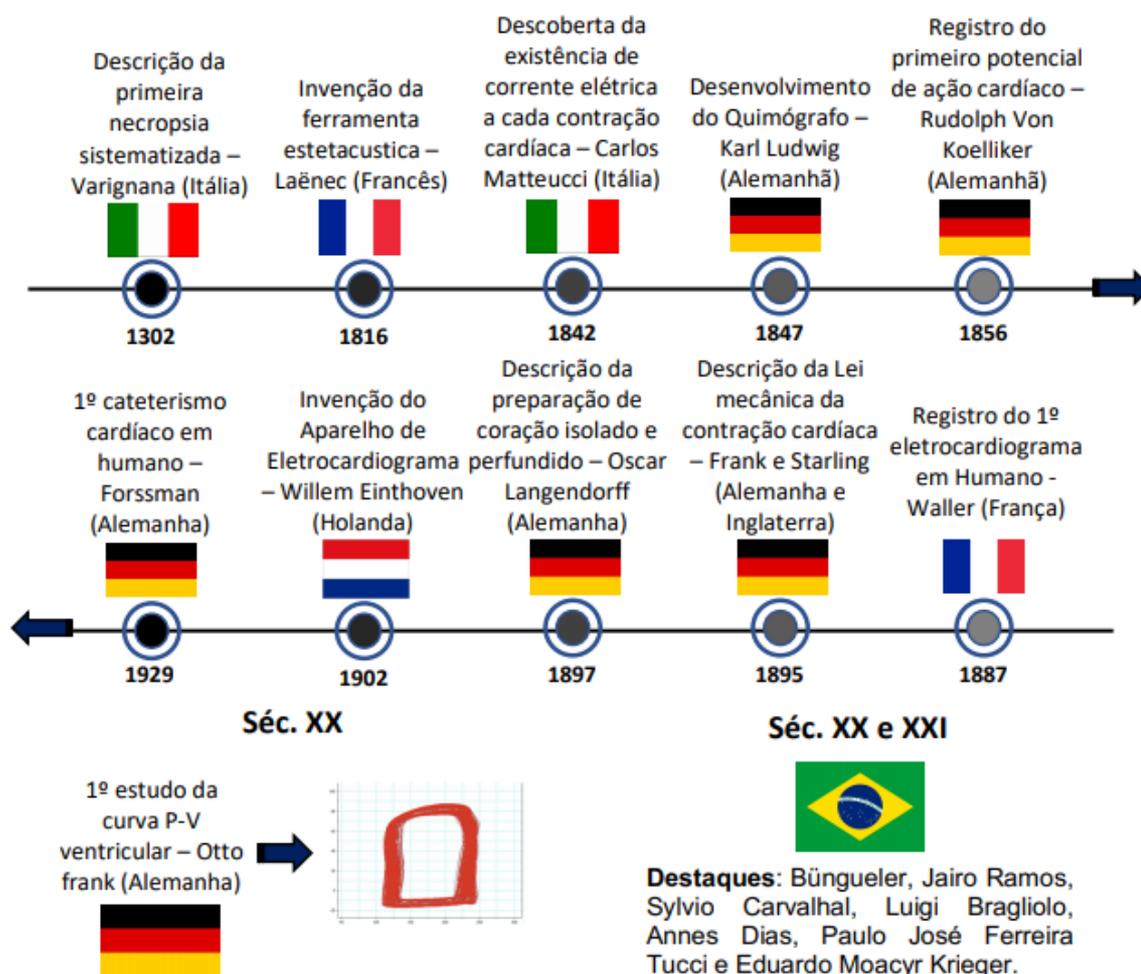


Figura 2: Linha temporal contendo os principais pesquisadores, suas nacionalidades e contribuições na área da fisiologia e estudo da função cardíaca. Fonte: o autor.

Na Figura 2 observamos uma linha temporal, incluindo os principais pesquisadores que contribuíram para os estudos dentro da cardiologia. Após essa breve revisão histórica acerca dos métodos desenvolvidos para avaliação da função cardíaca, discutiremos o significado dos parâmetros cardiovasculares através da curva pressão-volume e as alterações cardíacas encontradas no decorrer da sepse, assunto que vem ganhando destaque, tendo em vista que a sepse é reconhecida como potente causador de insuficiência cardíaca aguda (RUSSEL et al., 2018).

1.3. PRINCIPAIS PARÂMETROS CARDÍACOS PARA AVALIAÇÃO DA BOMBA CARDÍACA

O cateter de condutância usado como técnica experimental para avaliação dos parâmetros cardíacos possui quatro eletrodos capazes de mensurar volume e um sensor capaz de obter medidas de pressão. Os dados ventriculares de P-V obtidos por essa metodologia estão relacionados às forças-comprimentos ativas e passivas no final da diástole e da sístole e são afetados não apenas pelas propriedades dos cardiomiócitos, mas também pela matriz vascular e extracelular, bem como pela geometria da câmara (CINGOLANI & KASS, 2011).

A caracterização da função cardíaca pode ser acessada pelas medidas da pressão-volume (P-V) ventricular obtidas no ventrículo através de um cateter de condutância, que funciona a partir da emissão de um campo elétrico capaz de avaliar *in vivo* e em tempo real a performance cardíaca. Pode-se dividir os parâmetros tipicamente obtidos de forma independente e dependente de volume, o que traz maior especificidade na avaliação da função contrátil ventricular (PACHER, 2008).

A análise da P-V, obtida através do cateter de condutância é uma abordagem analítica detalhada e precisa da função da câmara cardíaca que permite avaliar diversos parâmetros cardíacos, sendo escolhidos para serem analisados neste trabalho débito cardíaco, fração de ejeção, volume sistólico, pressão diastólica final, relaxamento isovolumétrico (TAU) e trabalho sistólico.

1.3.1. O débito cardíaco

A monitorização hemodinâmica através do débito cardíaco possibilita a avaliação da gravidade de distúrbios patológicos como a insuficiência cardíaca e os choques de origem séptica, hemorrágica ou cardiogênica. A leitura e interpretação do débito cardíaco também auxilia como ferramenta para o ajuste de tratamentos farmacológicos de maneira contínua (SQUARA, 2019).

O débito cardíaco, expressado em litros por minuto, é a quantidade de sangue que o coração consegue bombear por minuto. Matematicamente, o débito cardíaco é calculado pelo produto do volume sistólico e o número de batimentos por minuto (frequência cardíaca). Para uma interpretação correta desse parâmetro é preciso se atentar aos fatores que o influenciam, dentre eles destacam-se: i) frequência cardíaca, ii) contratilidade, iii) pré-carga e, iv) pós-carga (VINCENT, 2008), aspectos que serão abordados nos próximos parágrafos.

A frequência cardíaca é usualmente descrita como a quantidade de batimentos do coração por minuto. É um sinal físico modulado pelo sistema nervoso autônomo que pode ser afetada por várias condições e doenças, tornando-se um biomarcador de prognóstico cardíaco (VANDERLEI et al., 2009; BÖHM et al., 2015). É um determinante de fluxo coronariano, desempenho miocárdico e demanda miocárdica de oxigênio como o revisado nos trabalhos de Caetano & Alves, (2015); Boudoulas, Borer e Boudoulas, (2015).

O ciclo cardíaco é compreendido pelo período de relaxamento (diástole), que é o momento em que as câmaras cardíacas se enchem de sangue, e pelo período de contração (sístole), que ocorre quando o sangue é ejetado. Podemos explicar a contração cardíaca, baseados no mecanismo de Frank-Starling, segundo Tucci (1982) a contratilidade do músculo cardíaco está relacionada a três fatores independentes: i. a relação tensão-comprimento celular, fatores estritamente físicos; ii. concentração intracelular de cálcio e iii. sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, ou seja, a força de contração também dependerá da concentração dos íons de cálcio disponíveis no meio, intra e extracelular. (NATALI, 2004; KUHTZ-BUSCHBECK *et al.*, 2018)

A pré-carga é um elemento do débito cardíaco relacionado a quantidade de sangue que chega à câmara cardíaca durante o enchimento ventricular que é obtido através do grau de distensão miocárdica antes do encurtamento; foi inicialmente demonstrada por Frank-Starling, como uma propriedade intrínseca dos cardiomiócitos, (VINCENT, 2008). Outro fator determinante do débito cardíaco é a pós-carga, força exercida pelos ventrículos para ejetar o sangue a qual é diretamente dependente da pressão arterial e do tônus vascular (VINCENT, 2008). O aumento da pós-carga e rigidez aórtica desempenham papel importante em alguns casos de insuficiência cardíaca e sua diminuição é uma forma eficaz de melhorar a função ventricular (VENTETUOLO & KLINGER, 2014; JASHARI *et al.*, 2015).

Uma terapia bem direcionada na fase inicial da sepse deve objetivar o balanço entre a demanda oferecida e gasta de oxigênio, proporcionando benefícios significantes em longo e curto prazo, já que otimizam a contratilidade e a pré- e pós-carga cardíaca, diminuindo os riscos de colapso cardiovascular durante a doença.

1.3.2. Fração de ejeção

A fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE) é tomada como medida primária para avaliação da função ventricular esquerda e se faz essencial não só para o tratamento de doenças cardiovasculares, mas também para diagnosticar a potencial ocorrência de cardiotoxicidade a agentes farmacológicos (CIKES & SOLOMON, 2015). Ela é caracterizada pelo percentual de sangue que o ventrículo esquerdo ejeta para a aorta durante a sístole, tendo seus valores estimados por meio dos volumes sistólicos e diastólicos finais do ventrículo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). O cálculo da fração de ejeção pode ser dado pela equação matemática (CHENGODE, 2016):

$$FEVE = VSVE/VDFVE \times 100\% = (VDFVE - VSFVE)/VDFVE \times 100\%$$

em que: FEVE – Fração de Ejeção Ventricular Esquerda; VSVE – Volume Sistólico do Ventrículo Esquerdo; VDFVE – Volume Diastólico Final no Ventrículo Esquerdo; VSFVE – Volume Sistólico Final no Ventrículo Esquerdo.

1.3.3. Volume sistólico

O volume total de sangue enviado para todo o organismo a cada batimento cardíaco é denominado de volume sistólico. Alterações neste parâmetro afetam diretamente tanto o percentual de sangue ejetado pelo coração, quanto a quantidade de sangue bombeada por minuto, e sendo assim pode ser utilizada para a monitorização de volume e resposta à fluidoterapia.

O pulso arterial, dado a partir da resistência arterial e o volume de sangue restante na aorta no final da diástole, influencia o volume sistólico, um exemplo desta situação é durante a fase hiperdinâmica da sepse, quando ocorre aumento do débito cardíaco pela baixa resistência arterial (MAGDER, 2016). Levando em conta a lei de Frank-Starling uma maneira de avaliar a resposta à fluidoterapia adequada, é através do volume sistólico e marcadores de pré-carga, que podem confirmar se a terapia foi capaz de preencher as câmaras cardíacas e assim assegurar que a reposição de fluidos não aumentará exacerbadamente as pressões de enchimento, possibilitando a administração segura e a manutenção de um volume sistólico adequado (MARIK, MONNET e TEBOUL, 2011).

1.3.4. Pressão diastólica final

Trata-se de um parâmetro que indica a pressão intracavitária do ventrículo esquerdo na fase final da diástole, antes do fechamento da valva mitral. Um aumento deste parâmetro pode sugerir uma possível rigidez da câmara cardíaca pelos distúrbios miocárdicos diastólicos de longa duração. Por exemplo, durante doenças como a isquemia endocárdica e a rigidez aórtica, há aumento da pós-carga, o que provoca maior esforço da musculatura cardíaca para bombear o sangue para o sistema.

Quando isso ocorre de maneira crônica acaba ocasionando uma hipertrofia dessa musculatura que provoca aumento da demanda de oxigênio para a musculatura cardíaca e aumento da pressão diastólica final. Portanto, pode-se assim dizer que este parâmetro também é utilizado para avaliação da hipertrofia cardíaca. (JASHARI et al., 2015).

O aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo é sinônimo de uma redução da sua capacidade de relaxamento durante a diástole, e por isso é considerado um marcador importante para o diagnóstico de disfunção diastólica ventricular esquerda. Uma pressão de enchimento ventricular elevada pode ser um indicador de insuficiência cardíaca (OKOSHI et al., 1999; PAULUS et al., 2007).

1.3.5. Índice de relaxamento isovolumétrico (TAU)

A constante do tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo, denominada de TAU, é um parâmetro que permite avaliar a cinética de relaxamento ventricular esquerdo durante a diástole.

Pinto et al., (2007) e Graziosi (1998) referem que o cálculo dos parâmetros de TAU permite uma avaliação simultânea das funções diastólicas e sistólicas do ventrículo esquerdo, demonstrando-se uma ferramenta eficaz na detecção de alterações nas funções cardíacas em diferentes miocardiopatias. O cálculo de TAU pode ser mensurado pela média de três intervalos consecutivos, que são o tempo de contração isovolumétrica (TCI), o tempo de ejeção (TE) e o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRI), através da fórmula:

$$\text{TAU} = (\text{TCI} + \text{TRI}) / \text{TE}$$

De acordo com os estudos de Stoddard *et al.*, (1989), Graziodi (1998) e Correia-Pinto *et al.*, (2002) acerca deste parâmetro, quando há prolongamento do tempo de relaxamento isovolumétrico, o relaxamento ventricular está prejudicado. Como exemplo, têm-se as miocardiopatias hipertróficas, insuficiências ventriculares e miocardiopatias dilatadas nas quais usualmente encontramos aumento do TAU. Uma anormalidade no relaxamento pode provocar aumento da pressão diastólica final e consequente aumento da pressão atrial

1.3.6. Trabalho sistólico

A energia gasta pelo ventrículo esquerdo para ejetar determinado volume de sangue durante um ciclo cardíaco completo é determinada a partir do trabalho sistólico (BOMBARDINI *et al.*, 2019). Este parâmetro é a base para o cálculo do funcionamento mecânico do coração e o consumo de oxigênio pelo miocárdio. Ele é dado pela avaliação dos volumes e pressões sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo (SONG *et al.*, 2009).

Na figura obtida através da análise da curva P-V ventricular esquerda o trabalho sistólico é dado através da análise da área formada a partir das diferentes pressões e volumes. Em situações como insuficiência cardíaca do tipo sistólica é possível observar uma redução deste parâmetro o que provoca um menor volume de ejeção (BOLT *et al.*, 2009; SCHILLER, VIKHOLM e HELLGREN, 2015). O seu aumento, por sua vez, sugere um consumo maior de oxigênio pelas células cardíacas na tentativa de manter o débito cardíaco, que em longo prazo, pode levar o coração a exaustão e assim, causar lesões miocárdicas.

1.4. OS SOBREVIVENTES À SEPSE

É certo que durante o choque séptico há a disfunção orgânica grave com presença de insuficiência cardíaca caracterizada por fração de ejeção e débito cardíaco diminuído. Estudos apontam o desenvolvimento de miocardiopatias em mais de 50% dos pacientes diagnosticados com sepse e a presença de isquemia global após vasodilatação periférica (CRUZ e REIS, 2017; RUDGER e SINGER, 2007; ATONUCCI *et al.*, 2016; VALLABHAJOSYULA *et al.*, 2017). Entretanto, nem todo paciente que desenvolve sepse e choque séptico evolui para óbito.

Cerca de 40 a 60% das pessoas com sepse ou choque séptico sobrevivem, se recuperam e alcançam a alta hospitalar (ANNANE *et al.*, 2007). Porém, as consequências da sepse parecem não ser restritas apenas à fase aguda da doença, uma vez que entre os sobreviventes há maior risco de morte ao longo dos anos subsequentes à alta hospitalar. Em um estudo multicêntrico que acompanhou os sobreviventes à sepse, observou-se comprometimento importante na qualidade de vida desses pacientes até seis anos após a alta hospitalar (ZHANG *et al.*, 2013).

Um estudo observacional revelou que os sobreviventes à sepse apresentam aumento substancial das necessidades de saúde pelas morbidades provenientes da doença, sugerindo então maior necessidade de manejo pós-alta (PRESCOTT et al., 2016). A readmissão hospitalar de pacientes sobreviventes à sepse é comum e resulta em maior mortalidade e custos substanciais à saúde pública e privada, reforçando a necessidade da conscientização acerca de novas políticas de saúde que possam prever essas readmissões e desenvolver intervenções direcionadas para essa população (GOODWIN et al., 2015).

Dentre os sobreviventes do insulto séptico, os eventos cardiovasculares seriam uma causa importante para o aumento da mortalidade em longo prazo, uma vez que incidentes como infarto agudo do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais, ataque isquêmico transitório e revascularização da artéria coronariana apresentam uma incidência de aproximadamente 30%. Os sobreviventes da sepse apresentam risco 13 vezes maior de desenvolver evento cardiovascular, quando comparados com indivíduos da mesma faixa etária que não tiveram sepse (YENDE et al., 2014) e enfrentam uma série de desafios fisiológicos, físicos e psicológicos associados à sua recuperação, como cansaço exarcebado, dores musculares, mudanças de humor, depressão e transtornos de sono (HUANG et al., 2018).

Estima-se que a maioria dos pacientes sépticos desenvolvem disfunção ventricular esquerda, porém o impacto clínico que essa situação traz em longo prazo ainda é pouco pesquisado (SANFILIPPO et al., 2015; PULIDO et al., 2012). A revisão de Merx & webber (2007) e a pesquisa em humanos de Vallabhajosyula *et al.*, (2017) revelam que a existência de disfunções cardiovasculares persistentes após a sepse é multifatorial e inclui desde disfunções orgânicas extra- cardíacas, desregulação do sistema imunológico e anormalidades coagulativas, até alterações nas estruturas intracelulares dos cardiomiócitos e disfunções mitocondriais.

Um artigo publicado na revista da *American Heart Association* ressalta a importância de mais estudos sobre as consequências cardiovasculares aos que sobrevivem à sepse a fim de mitigar os efeitos adversos como a maior incidência de doenças arteriais coronarianas (DACs), insuficiência cardíaca congestiva e doenças vasculares periféricas (SHIH et al., 2017).

Um estudo prospectivo que aborda os sobreviventes à sepse demonstrou a existência de mudanças físicas e fisiológicas no pós-sepse, dando destaque para o aumento das deficiências fisiológicas e mentais autorrelatadas, a piora no cansaço, na perda de memória, função sexual e dores no corpo (Huang *et al.*, 2018). Esse conjunto de alterações orgânicas acaba prejudicando significativamente sua capacidade física, reduzindo a tolerância dos sobreviventes para a realização das atividades normais da vida diária. Segundo dados de Prescott & Angus (2018), as causas da capacidade física reduzida vão ao encontro da combinação das lesões que afetam o sistema cardiorrespiratório nos sobreviventes à sepse, incluindo a exacerbação da insuficiência cardíaca congestiva e doença pulmonar obstrutiva crônica. A sepse parece contribuir negativamente para o aumento progressivo dos riscos cardiovasculares em pacientes que sobrevivem a ela, elevando as taxas de readmissão hospitalar.

O impacto das complicações cardiovasculares nos sobreviventes à sepse leva esses pacientes a terem maior mortalidade após a alta hospitalar, quando comparado com pacientes que não apresentaram, confirmando que incidentes cardiovasculares no período pós-sepse tem impacto negativo na sobrevivência desses pacientes em longo prazo (WU *et al.*, 2019). As alterações cardiovasculares nos sobreviventes à sepse nos direcionam para a importância de se avaliar a existência de alterações cardíacas que permanecem após o desenvolvimento e recuperação da sepse e, em caso positivo, investigar as vias envolvidas nessas possíveis alterações funcionais que podem propiciar o desenvolvimento de tratamentos eficazes na diminuição das sequelas decorrentes do processo séptico.

1.5. CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

A sepse é uma doença infecciosa caracterizada por disfunção orgânica grave, pelo processo inflamatório persistente e descontrolado, causa altos índices de morbidade e mortalidade, e gera aumento dos gastos com a saúde pública. Contudo, nem todos os pacientes que evoluem para sepse ou choque séptico morrem. Muitos deles podem evoluir para alta hospitalar, mas acabam

herdando sequelas negativas da doença, principalmente no sistema cardiovascular.

No mês de agosto do ano de 2020 realizamos um levantamento bibliográfico através da base de dados *Pubmed*, tendo como linha temporal os últimos dez anos, excluindo os artigos de revisões bibliográficas e usando os descritores sepse (*sepsis*) e sobreviventes à sepse (*sepsis survivors*). Apesar dos impactos da doença os resultados nos mostram que nesse período 3.790 artigos foram publicados envolvendo o tema sepse e apenas 137 artigos os sobreviventes à sepse.

Dentre os trabalhos encontrados observamos um número alto de pesquisas aborda a fisiopatologia da doença, analisam seus impactos na saúde pública e sugerem alternativas terapêuticas para enfrentá-la, entretanto esquecem que parte dos pacientes recebe alta hospitalar e enfrentam as sequelas físicas, psicológicas e sociais da doença. Entre os estudos experimentais encontrados, em animais não humanos, o modelo mais utilizado para mimetizar os efeitos da sepse é o de ligadura e perfuração do ceco. O sistema cardiovascular, o imuno-hematológico e o sistema nervoso central ganham destaque dentro das pesquisas sendo divididos em metodologias *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*.

Destacamos que durante o levantamento realizado não encontramos estudos *in vivo* que utilizaram a metodologia de cateterismo cardíaco ventricular esquerdo através de cateter pressão-volume, sugerindo ser este trabalho o primeiro a abordar esta metodologia no estudo dos sobreviventes à sepse. A hipótese central deste estudo é que a sepse e o choque séptico, por tratar-se de morbidades graves, sejam responsáveis por alterações na função cardíaca que persistem ou se desenvolvam após um insulto séptico. Neste contexto, nosso trabalho foi desenvolvido para explorar essas alterações e através dos resultados contribuir para o melhor entendimento do processo fisiopatológico, permitindo avanços nas propostas terapêuticas e diagnósticas.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever as principais alterações cardíacas observadas durante e após a progressão da sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco, com ênfase nas consequências do insulto para o coração de ratos sobreviventes à sepse.

2.1.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar as alterações orgânicas encontradas em animais expostos ao modelo de indução a sepse, da fase aguda à recuperação;
2. Avaliar a função cardíaca *in vivo*, durante e após a sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco em ratos;
3. Avaliar a função cardíaca *in vitro*, em animais sobreviventes à sepse 30 dias após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco;
4. Avaliar e comparar a resposta cardíaca a dobutamina nos modelos *in vivo* e *in vitro*, em animais expostos ao modelo de indução a sepse, da fase aguda à recuperação;
5. Avaliar e comparar a responsividade cardíaca através do modelo *in vivo*, resultantes das alterações pressóricas provocadas pela fenilefrina, em animais sépticos e sobreviventes à sepse;
6. Investigar as possíveis alterações entre os agentes oxidantes e anti-oxidantes provocadas pelo processo séptico no coração de animais sobreviventes à sepse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos com 14 a 16 semanas de idade, pesando entre 250-350g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, em ambiente com temperatura (21 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro a cada 12/12 horas) controladas. Água e ração foram fornecidas à vontade aos animais. Foi aguardado um período de ambientação desses animais de pelo menos cinco dias dentro do biotério do laboratório antes que os experimentos fossem realizados.

Todos os protocolos realizados foram previamente avaliados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), e estavam de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA, 2013; CONCEA); protocolo número 2349200618.

3.2 SOLUÇÕES, DROGAS E REAGENTES

Salina tamponada com fosfato (PBS, composição em mM: 137 de NaCl, 2,7 de KCl, 1,5 de KH_2PO_4 e 8,1 de NaHPO_4 ; pH de 7,4); solução de Krebs (pH 7,4; composição em mM: NaCl, 118,4; KCl 4,7; KH_2PO_4 , 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5; D-glucose 11,7; NaHCO_3 , 26,5), salina tris-tamponada com tween 20 (TBS-T, composição em mM: 137 de NaCl, 2,7 de KCl, 1,5 de KH_2PO_4 , 20 de Na_2HPO_4 , acrescido de tween-20 0,05%), tampão fosfato de potássio (composição em mM: 3,2 de K_2HPO_4); TRIS HCL (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); isoflurano, (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil), cloridrato de xilazina (VetBrands, Jacareí, São Paulo, Brasil), cloridrato de cetamina (Syntec, Cotia, São Paulo, Brasil), cloridrato de lidocaína (2%, sem vasoconstritor), cloridrato de tramadol (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil), heparina sódica 5000 UI/ml (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil); fenilefrina, dobutamina, butilhidroxitolueno, ácido tricloracético, acetato de sódio, pirogalol, glicose, glutatona, ácido ditionitrobenzóico, brometo de hexadecil

trimetilamônio, peróxido de hidrogênio, nitrofenil n-acetil beta d-glicosaminideo, citrato de sódio dihidratado, tetrametilbenzidina (todos da Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); álcool metílico, xilol (Neon, Suzano, São Paulo, Brasil); albumina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); EDTA (Merck, Temecula, CA, USA); glicina (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos contaram com um total de 4 grupos para escolha do modelo de CLP ideal, sendo eles: grupo falso operado, grupos CLP 1 furo, CLP 2 furos e CLP 3 furos. Após a escolha do grupo CLP 3 furos, a função cardíaca foi analisada nos tempos de 6, 24, 72 horas e, também, 15 e 30 dias após a indução a sepse. A fase inicial da sepse foi destacada como a 6^a e 24^a hora após o procedimento. A fase de recuperação a 72^a hora e os sobreviventes, o tempo de 15 e 30 dias após a CLP. A Figura 3 representa o desenho esquemático dos procedimentos utilizados nesta pesquisa.

3.4 PROTOCOLOS ANESTÉSICOS

Para os experimentos de cateterismo do ventrículo esquerdo, os animais foram anestesiados através da administração de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), pela via intramuscular, a qual foi suplementada em intervalos de 45-60 minutos, quando necessário. O anestésico local lidocaína (2%, sem vasoconstritor) foi infiltrado nos sítios cirúrgicos (injeções intradérmicas e subcutâneas na região ventral do pescoço, e intramusculares nos músculos esterno-hióideo, omo-hióideo e esternomastóideo), no volume final de 100 µL para cada sítio de infiltração, antes da incisão, separação dos tecidos e localização/isolamento da artéria carótida direita.

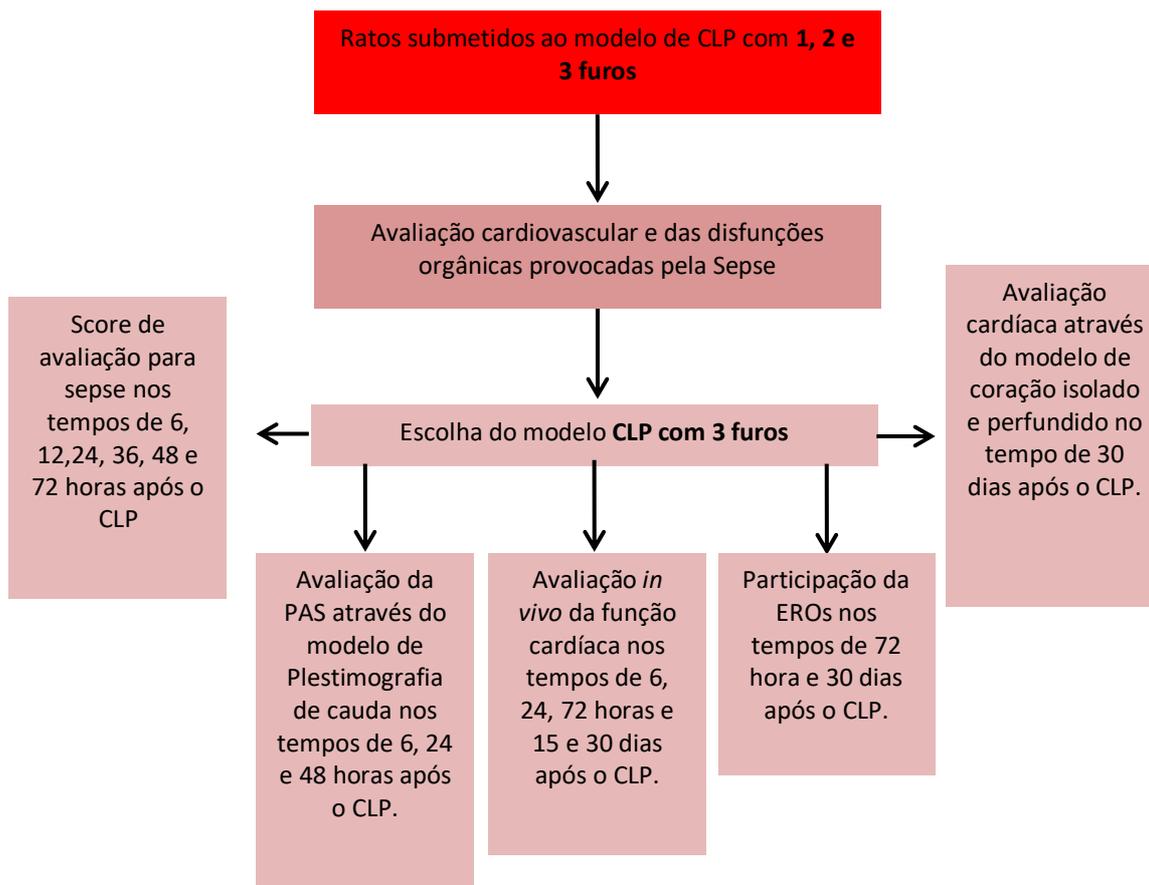


Figura 3. Esquema correspondente ao desenho experimental. Para a realização dos nossos experimentos, em um primeiro momento, fizemos diferentes tipos de CLP (1, 2 ou 3 furos no ceco) e então realizamos a avaliação cardiovascular e das disfunções provocadas pela sepse. Os Resultados nos mostraram que apenas os grupos que receberam 3 perfurações no ceco foram capazes de apresentar as alterações clássicas da sepse, sendo assim os demais experimentos foram realizados em animais CLP 3 furos. Após a escolha do modelo de CLP ideal os animais foram avaliados através da aplicação do score para sepse (6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após a CLP), tiveram a pressão arterial sistólica verificada pelo modelo de plestimografia de cauda (6, 24 e 48 horas após a CLP), a avaliação da função cardíaca pelo modelo de cateterismo intraventricular esquerdo (6, 24 e 72 horas e 15 e 30 dias após a CLP). Após identificarmos que no tempo de 72 horas os animais encontravam-se hemodinamicamente recuperados, mas com insuficiência cardíaca 30 dias após a CLP, avaliamos a participação das espécies reativas de oxigênio na disfunção cardíaca nesses tempos. Por fim, fizemos a avaliação, in vitro, dos corações de animais sobreviventes à sepse (30 dias após a CLP).

Para a realização da cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (modelo experimental conhecido pela sigla CLP do inglês *Cecal Ligation and Puncture*), os animais foram primeiramente sedados e analgesiados por meio de aplicação de xilazina e tramadol, nas dosagens de 5 e 10 mg/kg via intraperitoneal (i.p), respectivamente. Após 5 minutos, os animais foram

anestesiados em câmara anestésica saturada com mistura de isoflurano (5%) e oxigênio a 100%, seguido pela manutenção anestésica via máscara facial e respiração espontânea com mistura de isoflurano (3%) e oxigênio a 100%. Após a confirmação da ausência de reações a estímulos externos por pinçamento das patas e cauda, os animais receberam infiltrações subcutâneas na linha alba (locais da incisão cirúrgica) do anestésico local lidocaína 2%, sem vasoconstritor, no volume final de 200 μ L para cada sítio de infiltração.

Para a coleta dos corações, destinados à análise das espécies reativas de oxigênio, experimento *in vitro* com o coração isolado e perfundido, e mensuração do peso úmido/peso seco, assim como para coleta de sangue ventricular, os animais foram anestesiados com uma dose única de cetamina e xilazina, nas dosagens de 100 e 20 mg/kg, *i.p.*, respectivamente, administradas quando necessário. Somente após a confirmação do plano anestésico profundo é que o procedimento de coleta foi iniciado.

3.5 INDUÇÃO DA SEPSE PELO MODELO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP – CECAL LIGATION AND PUNCTURE)

A metodologia foi realizada conforme descrito por Rittirsch *et al.*, (2009), com algumas modificações. Após serem anestesiados, conforme descrição no tópico Protocolos Anestésicos (item 3.3), os animais foram submetidos a uma laparotomia com incisão de aproximadamente 2 cm e subsequente exposição e ligadura não obstrutiva do ceco (cerca de 75% usando como base a válvula ileocecal). O ceco foi perfurado com agulha 14G com 1, 2 ou 3 furos, seguido de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. Após a perfuração do ceco, o intestino foi recolocado na cavidade abdominal e a musculatura e a pele do animal foram suturadas (figura 4).

Em experimentos preliminares este procedimento não gerou mortalidade para os animais que receberam 1 ou 2 furos no ceco. Para os animais que receberam 3 furos a mortalidade ficou em torno de 60-70% em até 72 horas, com recuperação total do restante dos sobreviventes, sendo esse, então, o grupo escolhido para realizar os estudos pós-sepse no intervalo de 30 dias.

Após a cirurgia, todos os animais receberam 30 mL/Kg de solução salina isotônica via subcutânea (s.c.), para reposição volêmica, e foram mantidos em ambiente aquecido (manta térmica e lâmpada de aquecimento) até a recuperação completa da anestesia (60 a 120 minutos). Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo processo cirúrgico e pós-cirúrgico, sem a perfuração do ceco e extravasamento do conteúdo intestinal, sendo denominado grupo falso operado.

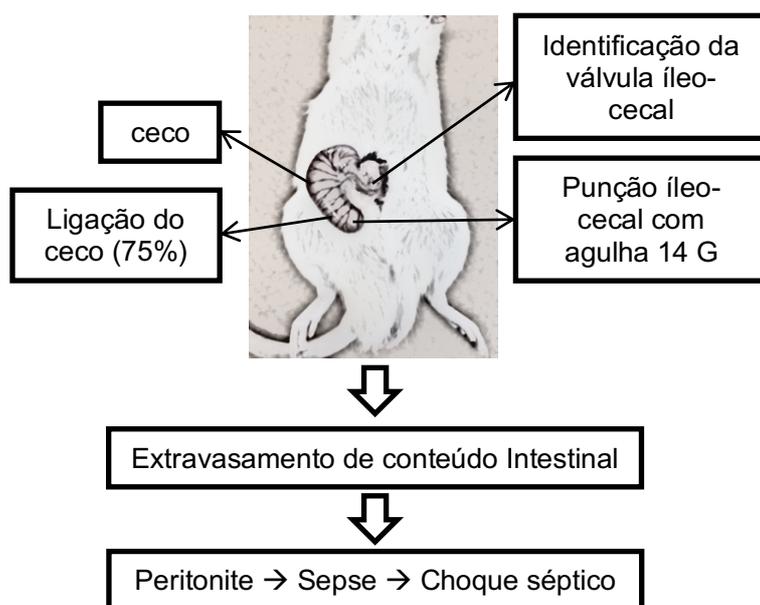


Figura 4: Representação esquemática do modelo para indução da sepse através da ligadura e perfuração do ceco (CLP). Após anestesiado, o animal teve suas vísceras expostas e foi identificada a válvula íleo-cecal, em seguida foi realizada a ligadura do ceco (cerca de 75%) e perfurações com agulha 14G na porção íleo-cecal. O conteúdo fecal foi exposto, as vísceras foram armazenadas no local de origem e então a parede abdominal foi suturada. Fonte: autor.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DA SEPSE GERADA PELO MODELO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO

No intuito de acompanhar os sinais de sepse decorrente do processo de indução da pelo CLP, adaptamos a ferramenta de avaliação proposta por Araújo *et al.*, (2012). Após protocolo cirúrgico, os animais foram avaliados individualmente nos tempos de 6, 12, 24, 36 e 72 horas.

Os parâmetros avaliados foram: piloereção, dispneia, secreção lacrimal, ausência de fezes ou presença de diarreia, contração abdominal, aumento ou queda da temperatura corporal (via aferição retal), ausência de

respostas aos estímulos ambientais, redução da atividade motora e ausência de atividade exploratória. Os animais recebiam 0 de pontuação quando não apresentavam os parâmetros avaliados, e 1 para cada parâmetro detectado, sendo o limite de 9 pontos.

Para sistematizar a avaliação dos sinais associados com o desenvolvimento de sepse foi utilizada o quadro 1, onde observamos nos diferentes tempos a presença ou não de sinais indicativos de sepse. Os animais foram identificados por números romanos na região caudal, também identificávamos o número da sua caixa e grupo (CLP ou controle). Quando a alteração era presente o animal recebia a pontuação 1 e quando não, recebia a pontuação 0. A cada horário era realizado a soma total dos pontos.

Os animais que apresentaram pontuação máxima, durante os tempos avaliados, foram submetidos à eutanásia através de uma dose letal de cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente), a fim de evitar sofrimento do animal. Os animais que receberam pontuação máxima e por isso foram eutanasiados, não entraram para o n da curva de letalidade. Para caracterização da severidade do modelo e média de sobrevivência após o CLP, esses animais foram monitorados diariamente durante 7 dias.

Quadro 1: Ferramenta utilizada para avaliação dos sinais de sepse em animais submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco.

Animal nº _____	Caixa: _____	CLP () Controle ()				
Parâmetros	Avaliação					
Piloereção	6 h:	12 h:	24 h:	36 h:	72 h:	
Dispneia	6 h:	12 h:	24 h:	36 h:	72 h:	
Secreção lacrimal	6 h:	12 h:	24 h:	36 h:	72 h:	
Contração abdominal	6 h:	12 h:	24 h:	36 h:	72 h:	
Ausência de fezes ou presença de diarreia	6 h:	12 h:	24 h:	36 h:	72 h:	
Aumento ou queda da temperatura corporal	6 h:	12 h:	24 h:	36 h:	72 h:	
Ausência de respostas aos estímulos ambientais	6 h:	12 h:	24 h:	36 h:	72 h:	
Redução da atividade motor	6 h:	12 h:	24 h:	36 h:	72 h:	
Ausência de exploração do ambiente	6 h:	12 h:	24 h:	36 h:	72 h:	
Total:	6 h:	12 h:	24 h:	36 h:	72 h:	

3.7 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada pelo método de pletismografia de cauda. Para aplicação desta técnica foi utilizado um manguito na cauda do animal (*tail cuff*) e um transdutor de pressão alocado também na região caudal, sendo ambos ligados a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, AD Instruments, Austrália). A partir desta metodologia foi possível obter dados de pressão arterial sistólica (PAS, em mmHg) e frequências cardíaca (FC, em batimentos por minuto).

Após a calibração do sistema, os animais foram transferidos para a sala de experimentação trinta minutos antes do início dos procedimentos, para devida ambientação. Após esse período, os animais foram acondicionados em tubos acrílicos de contenção, um por vez, e acomodados sobre placa aquecida, para manter a temperatura corporal de aproximadamente 37 °C. Respeitado um intervalo de 10 minutos para adaptação do animal ao procedimento, o sensor foi colocado na região proximal da cauda, para obtenção dos valores da PAS. Foram realizadas 3 medidas por animal nos tempos de 6, 24 e 72 horas após o protocolo cirúrgico. A média dos valores obtidos foi comparada entre os diferentes grupos.

3.8 ANÁLISE *IN VIVO* DA FUNÇÃO CARDÍACA PELO MODELO DE CATETER DE PRESSÃO E VOLUME

Para a inserção do cateter no ventrículo esquerdo, os animais foram anestesiados, conforme descrito no item 3.3. A temperatura corporal dos animais foi mantida por meio de uma placa aquecida entre 36,9°C e 37,7°C. Após a confirmação de ausência de respostas a estímulos, realizou-se uma punção da veia caudal lateral, para inserção de um cateter intravascular de tamanho 24 G, utilizado para a administração de 10 UI de heparina, com intuito de prevenir a formação de coágulos durante o procedimento de cateterismo.

Após a anticoagulação uma incisão foi realizada na região ventral do pescoço separando tecido tegumentar dos músculos esterno-hióideo, omo-hióideo e esternomastóideo a fim de dissecar a artéria carótida direita, a isolando do nervo vago. Após a dissecação um cateter de pressão e volume (modelo SPR-901, Millar Instruments, Houston, TX, EUA) foi inserido no ventrículo esquerdo, através da artéria carótida direita (figura 5). O cateter foi conectado ao sistema de pressão e volume (MPVS-Ultra Single Segment Pressure-Volume Unit®; Millar Instruments, Houston, TX, EUA), e acoplado ao hardware e software de aquisição de dados (PowerLab 4/30® e LabChart® Pro v. 7.3.3, respectivamente; ambos de AD Instruments, Castle Hill, Austrália), os quais registraram as avaliações hemodinâmicas em tempo real.

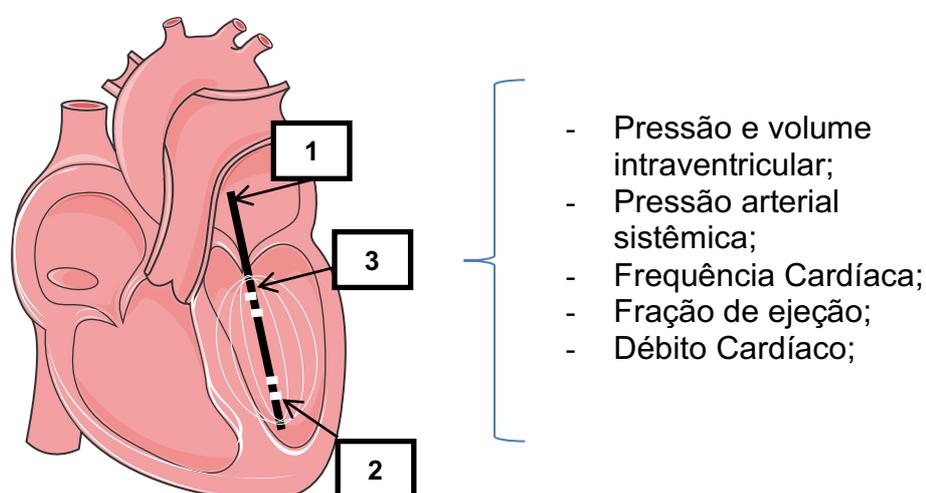


Figura 5: Representação gráfica da posição do cateter pressão volume durante a avaliação *in vivo* da função cardíaca. (1) representa o cateter de condutância intracardíaco, (2) é o eletrodo de emissão e (3) o de captação. Fonte: Figura modificada pelo autor a partir de imagens obtidas de *Smart Servier Medical Art*.

Desta forma, a confirmação da posição correta do cateter no interior da câmara ventricular esquerda foi realizada mediante a observação das curvas ventriculares características de pressão e volume conforme apresentado no registro A da Figura 6. Para a calibração do volume e pressão, foi utilizada o método da cubeta, avaliando-se áreas e volumes conhecidos através do sistema de informação MPVS-Ultra (MPVS-Ultra®, v2.0, Millar Instruments, Houston Texas, EUA).

Ao término dos experimentos foi coletado aproximadamente 1 ml de sangue através da artéria carótida para o preenchimento das cubetas.

Seguindo as orientações do fabricante para o cateter SPR838 (Millar Instruments, Houston, TX, EUA) preenchemos as cubas de 2, 3, 4 e 5 mm de diâmetros, as quais corresponderam, em volume de sangue, a 28.27, 63.62, 113.10 e 176.71 μ l, respectivamente. Automaticamente após a identificação dos pontos de calibração os valores de volume ventricular foram atualizados.

Além das avaliações em tempo real da pressão e volume intraventricular, pressão arterial sistêmica (PA), eletrocardiografia e frequência cardíaca (FC), também foram avaliados o débito cardíaco (DC), o volume diastólico final (VDF), volume sistólico (VS), fração de ejeção (FE), elastância arterial (Ea), trabalho sistólico (TS), volume máximo e mínimo durante o ciclo cardíaco e outros 18 parâmetros, os quais foram calculados pelo software de registro (Apêndice 1).

Após a obtenção do registro basal desses animais, respeitando-se o tempo de 5-10 minutos para estabilização, foi administrado uma dose endovenosa *in bolus* de fenilefrina (30 nmol/Kg) e outra de dobutamina (30 nmol/Kg), ambas com o intervalo de 10 minutos entre as administrações. As alterações na função cardiovascular foram avaliadas no ponto basal e após a administração das drogas, e comparadas entre os grupos nos diferentes tempos. Ao término dos experimentos, os animais foram eutanasiados, por exposição a doses elevadas do anestésico cetamina e xilazina.

3.9 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA EM CORAÇÃO ISOLADO E PERFUNDIDO UTILIZANDO O MÉTODO DE LANGENDORFF

Para realização desses experimentos foi utilizado apenas os grupos de animais sobreviventes 30 dias após a indução da sepse pelo modelo de CLP, e de animais falso operados. Após a confirmação do plano anestésico profundo, 10 minutos antes dos procedimentos cirúrgicos para retirada do coração, os animais receberam o anticoagulante heparina (200 UI, via S.C.), a fim de evitar coagulação intravascular.

Os animais sofreram uma incisão cirúrgica subdiafragmática e bilateral ao tórax, para abertura do mesmo. Em seguida, os pulmões e outros tecidos adjacentes foram retirados e o arco aórtico foi localizado. Um cateter maleável com guia rígido (tamanho 20), conectado a uma bomba de perfusão contínua

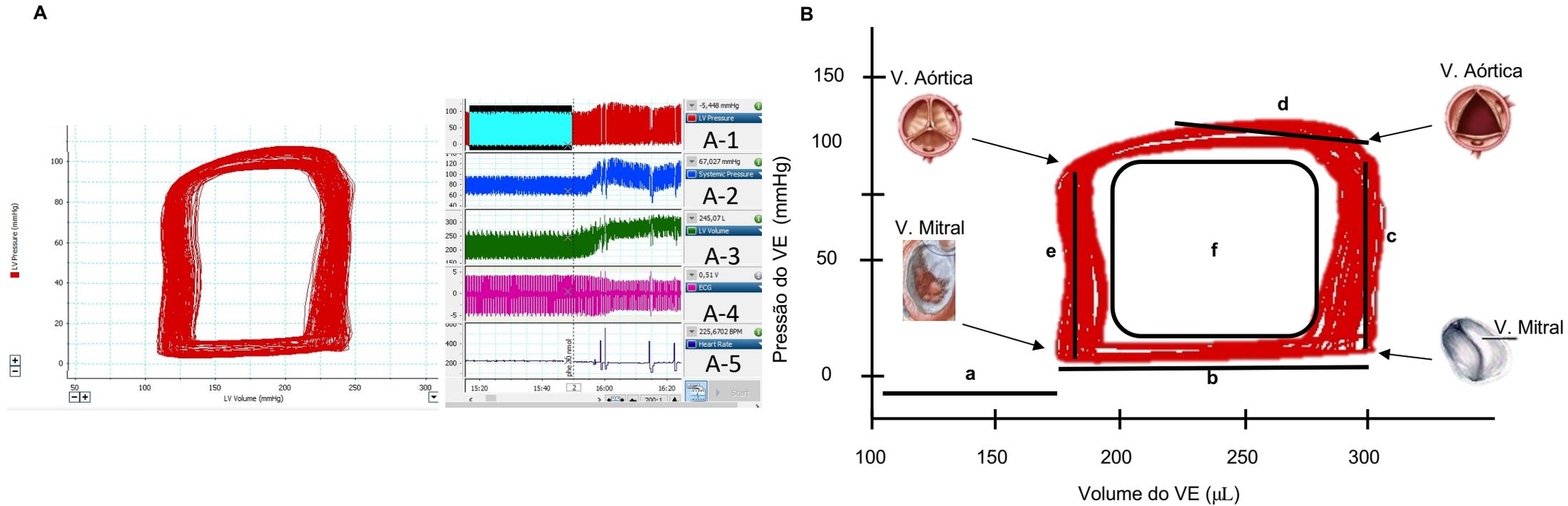


Figura 6: Parâmetros hemodinâmicos avaliados a partir da curva P-V. Os painéis A e B foram originados a partir dos registros típicos das medidas hemodinâmicas obtidas pelo cateter de condutância, inserido no ventrículo esquerdo através da artéria carótida de animais controle previamente anestesiados. No painel A, temos a representação gráfica original de um registro de P-V no ventrículo esquerdo, confirmando a posição correta do cateter, onde A1 representa o registro gráfico da pressão do ventrículo esquerdo, A2 pressão sistêmica, A3 volume do ventrículo esquerdo, A4 eletrocardiograma e A5 frequência cardíaca. No painel B temos um gráfico construído a partir dos registros do painel A, contendo das explicações acerca dos principais acontecimentos hemodinâmicos, onde: a. condiz com a Pressão Diastólica Inicial (PDI); b. retrata o período de enchimento ventricular, onde o volume presente na câmara cardíaca até o fechamento da valva mitral é denominado Volume Sistólico (VS); c. período de contração isovolumétrica, que tem início a partir do fechamento da valva mitral e seus valores pressóricos representam a Pressão Sistólica Final (PSF); d. período de ejeção ventricular esquerda, iniciado após a abertura da valva aórtica. Nesse período, a pressão exercida para a ejeção do sangue é denominada como pressão sistólica; e. Período de relaxamento isovolumétrico, segue do fechamento da valva aórtica até a abertura da valva mitral, através da relação entre o tempo e a pressão exercida nesse período, obtemos os valores para TAU; f. área geométrica que representa o gasto energético necessário para um batimento cardíaco, o Trabalho Sistólico (TS). Fonte: autor.

(4 ml/min), contendo solução salina fisiológica aquecida, aerada com 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico, foi inserido no interior da aorta descendente. Imediatamente após a inserção do cateter foi iniciada uma perfusão retrógrada do leito vascular coronariano e, assim, do coração. Para fixação do cateter foi utilizado um fio de algodão.

Antes de ser retirado da cavidade torácica, o coração foi cuidadosamente dissecado de suas artérias e veias. O coração foi colocado em um aparato de Langendorff modificado, sob uma pré-carga de 1 grama. A avaliação da força gerada pelo coração durante suas contrações foi determinada por transdutores de força (model FT-03, Grass Instruments, Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, USA), fixados no ápice do coração, e a pressão da perfusão coronariana foi avaliada por um transdutor de pressão acoplado ao sistema de perfusão contínua. Os dados foram obtidos e gravados digitalmente através do sistema Powerlab (Labchart AD Instruments, Castle Hill, Australia).

Para este experimento foi respeitado o tempo de 10 minutos para estabilização da amostra, e de 5 minutos de registro contínuo da perfusão e batimentos cardíacos para determinação dos valores basais para pressão de perfusão coronariana (mmHg), força desenvolvida (gramas), frequência cardíaca (BPM) e duração do ciclo cardíaco. A partir dos dados do ciclo cardíaco foram retirados os tempos sistólicos e os tempos diastólicos. Além dos valores basais, também foi avaliada a resposta desses corações às doses *in bolus* de dobutamina (3,10 e 100 nmol), sempre respeitando o intervalo de dez minutos entre as doses.

3.10 PROPORÇÃO DE MASSA TECIDUAL PELO PESO CORPORAL

Ao final dos experimentos de avaliação cardíaca *in vivo*, através do modelo de cateterização ventricular esquerda, os animais sofreram eutanásia e tiveram o coração e os pulmões coletados (excluindo-se vasos e tecidos conectivos), através de uma toracotomia total. Logo após a retirada, os tecidos foram secos com um papel filtro e, então, pesados, a fim de obtenção da proporção do peso molhado.

Após permanecerem um período de 24 horas em uma estufa com temperatura de 60°C, os corações e pulmões foram pesados novamente, para obtenção da proporção do peso seco. A proporção de massa tecidual de cada órgão foi calculada

a partir da fórmula: Proporção de massa cardíaca/pulmonar = peso do tecido molhado ou seco dividido pelo peso do animal (VAEZ *et al.*, 2016).

3.11 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE OXIDATIVA EM TECIDO CARDÍACO DE ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

A investigação das espécies reativas de oxigênio e atividade antioxidante foi realizada nos grupos de animais pertencentes ao tempo de 72 horas e 30 dias após o CLP, fases descritas como recuperação e sobrevivência, respectivamente e, em animais falso operados, os quais pertenceram ao grupo controle. Os animais foram previamente anestesiados e submetidos a uma toracocentese, a veia cava foi cateterizada com cateter 20 G, para serem perfundidos com solução salina hipertônica, a fim de retirar o sangue acumulado nos vasos.

Amostras do ventrículo cardíaco esquerdo foram preparadas conforme descrito resumidamente nos tópicos a seguir, para a determinação do conteúdo de: glutathione (GSH), mieloperoxidase (MPO), n-acetil-glucosamina (NAG), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e hiperóxidos lipídicos (LOOH). Os experimentos a seguir foram realizados em duplicada ou triplicata a fim de diminuir o erro experimental.

3.11.1 Glutathione reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados conforme a metodologia descrita por Sedlak & Lindsay (1978). Os tecidos foram homogeneizados com tampão fosfato de potássio (200 mM em pH 6,5), em seguida, 50 µl do homogenato foram acrescidos de 40 µl de ácido tricloroacético (12,5%) e centrifugados a 3000 rpm, em temperatura de 4 °C por 15 minutos. Em seguida, 10 µl do sobrenadante de cada amostra foi incubado em placa contendo 96 poços com tampão Tris-HCL (290 µl; 0,4 M, pH 8,9) e 5 µl de DTNB (0,01 M) por 20 minutos em temperatura ambiente. Para controle e cálculo dos valores obtidos, foi utilizada uma curva padrão de GSH nas concentrações de 10, 7,5, 5,0 e 1,25 µg/ml. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 415 nm e os valores expressos como µg de GSH/g de tecido.

3.11.2 Mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do conteúdo de MPO foi realizada utilizando a técnica descrita por Bradley *et al.*, (1982) e modificada por De Young *et al.*, (1989). Para essa dosagem, foram utilizadas as amostras contendo o sobrenadante dos homogenatos, os quais foram ressuspensos em 1 ml da solução de tampão fosfato 0,08M (pH 5.4) contendo HTAB 0,5% e centrifugados a 11000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Em uma microplaca contendo 96 poços foi adicionado 30 µl do sobrenadante da amostra acrescidos de 200 µl do MIX de tampão, onde: 100 µl do tampão fosfato 0,08 M + 85 µl do tampão fosfato 0,22M + 15 µl de H₂O₂ 0,01 %.

A atividade da MPO foi determinada a partir do sobrenadante na presença de H₂O₂, através do espectrofotômetro a 620 nm. A fim de iniciar a reação foi adicionado 20 µl de solução TMB, respeitado o tempo de 5 minutos para incubação em temperatura de 37°C. Os valores resultantes deste processo detectaram a atividade de mieloperoxidase e foram expressos como MPO/g de proteína.

3.11.3 N-acetil-glucosamina (NAG)

Para esta dosagem, foram utilizadas as amostras contendo o sobrenadante dos homogenatos, utilizando a técnica descrita por HABIG *et al.*, (1974). Os sobrenadantes receberam solução NAG, mais tampão citrato, e então foram incubadas por 60 minutos à 37° C. Após incubação, as amostras foram acrescidas de tampão glicina, no intuito de interromper a reação. Para esse experimento as amostras foram feitas em duplicata. Para estas leituras, foi utilizado espectrofotômetro a 405 nm. Os valores resultantes deste processo foram expressos em NAG/g de proteína.

3.11.4 Superóxido dismutase (SOD)

Para determinação da atividade de SOD no tecido de ventrículos esquerdo de animais controle e sobreviventes à sepse, foi utilizada a metodologia descrita por Marklund & Marklund (1974). Esta metodologia baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do composto químico aromático pirogalol. Para isto, 20 µl do sobrenadante obtidos a partir da homogeneização dos tecidos em tampão fosfato de potássio (200 mM, pH 6,5) foram adicionados a tubos contendo o composto pirogalol

(25 µl; 1 mM) e solução de Tris HCL-EDTA (443 µl; 200 mM, pH 8,5), e misturados em vórtex durante 60 segundos.

O tempo de 20 minutos foi respeitado para incubação em temperatura ambiente, em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 12,5 µl de HCL 1 N. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm, em temperatura de 4 °C, durante 4 minutos, e 300 µl deste sobrenadante pipetados em microplaca. A leitura de absorvância foi realizada a 440 nm.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os resultados comparados com o padrão (tampão Tris-EDTA com pirogalol sem incubação + média sem amostra e sem incubação), sendo este valor igual a 100%. A quantidade de proteína que inibe a reação em 50% equivale a 1 unidade de SOD e seus valores foram expressos como unidade (U) de SOD/mg de proteína.

3.11.5 Glutathione S-transferase (GST)

Para a determinação da atividade da enzima GST, foi utilizado o método descrito por HABIG *et al.*, (1974). A metodologia consiste na conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com o GSH, produzindo um dinitrofeniltioeter. Para isso, foi adicionado 200 µl do reagente (3 mM CDNB diluído em etanol PA e 3 mM de GSH diluído em tampão fosfato), a 100 µl do sobrenadante obtido com a homogeneização dos tecidos em tampão fosfato 200 mM com pH de 6,5. A leitura de absorvância foi realizada a 340 nm, em intervalos de 10 s, durante 1 minuto, e seus valores foram expressos em nmol de GST/min/mg de proteína.

3.11.6 Hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

Para a determinação do conteúdo de LOOH, foi utilizada a técnica descrita por Jiang, Woollard e Wolff (1991). Após serem homogeneizados em metanol (P.A. 1:4), os tecidos foram centrifugados pelo tempo de 20 minutos, a 9700 rpm, em uma temperatura de 4° C, e seu sobrenadante armazenado. O reagente FOX2 foi preparado a partir da dissolução de Xilenol laranja (1 nM), H₂SO₄ (125 µl), Fe (4,9 mg) e BHT (49 mg) em metanol 90%, protegidos da luz. O reagente FOX2 (240 µl) foi adicionado na alíquota do sobrenadante (60 µl). Essa mistura foi mantida em incubação, a temperatura ambiente, por 30 minutos e, em seguida, foi realizada a leitura de absorvância, a 560 nm. O processo descrito acima consiste na oxidação do

íon ferroso em íon férrico pelos LOOH, sob condições com pH ácido, gerando um complexo azul púrpura. Os valores LOOH resultantes deste processo foram expressos como $\mu\text{mol/mg}$ de tecido.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos com a média \pm erro padrão da média com $n = 4-8$ animais para cada grupo, conforme o descrito na legenda de cada figura. Para a análise estatística, foram utilizados o teste t de *Student*, ou a análise de variância de uma ou duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni, Dunnett's ou Newman-Keuls. Para a análise da curva de sobrevivência do teste de Mentel-Cox. Para os testes não paramétricos utilizou-se o teste de log-rank, Mann-Whitney. Foi considerado diferença estatisticamente significativa um valor de p menor que 0,05. Os gráficos foram desenhados e analisados estatisticamente utilizando a ferramenta *GraphPad Prism* versão 7 para IOS (GraphPad Software, San Diego, CA).

4. RESULTADOS

4.1. PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO – (CLP)

Para a padronização do modelo de indução à sepse, primeiramente, foram utilizados ratos machos Wistar (2-3 meses) pesando entre 250-300 g. Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo um deles o grupo controle (falso operado) e os demais expostos a 1, 2 e 3 perfurações no ceco, com uma ligadura de aproximadamente 75%. Após o procedimento cirúrgico, o percentual de sobrevivência, a partir da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, foi avaliado durante o período de 120 horas. T

Os resultados mostram que apenas os animais que receberam três perfurações no ceco morreram, com taxa de mortalidade de aproximadamente 60% em até 72 horas, e que após esse período não ocorreram mortes adicionais (Figura 7). Tendo em vista este primeiro resultado, optamos por utilizar o modelo de CLP com três perfurações no ceco, já que as avaliações dos parâmetros cardíacos se dariam a partir dos sobreviventes ao insulto séptico. Após a escolha, denominamos os animais CLP 3 furos apenas como CLP.

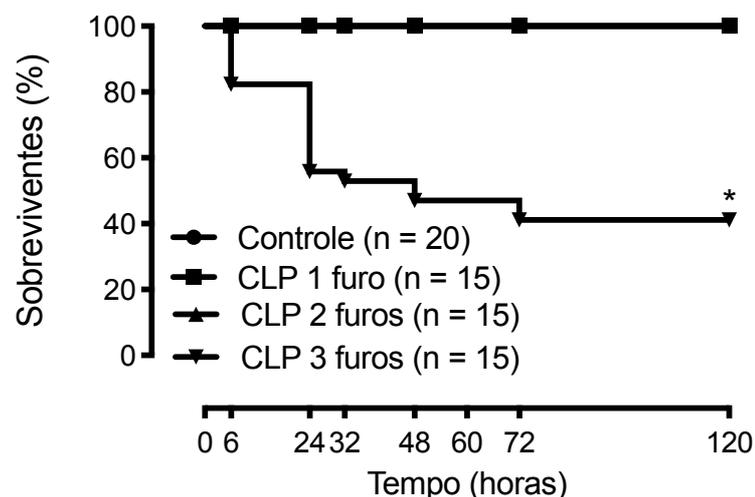


Figura 7: Curva de sobrevivência dos animais submetidos ao modelo de CLP. Os resultados representam a análise dos diferentes modelos de CLP (1, 2 e 3 furos) em comparação com os grupos controle, utilizando o modelo criado por Kaplan-Meier. O gráfico apresenta a média \pm erro padrão da média (EPM) utilizando a análise estatística o teste de Mantel-Cox. * Indica $P < 0,05$ dos animais CLP em relação ao respectivo grupo controle. Os símbolos do grupo controle e CLP 2 furos estão sobrepostos pelo símbolo do grupo CLP 1 furo.

Após a escolha do modelo, partimos para uma segunda etapa, em que analisamos a presença dos sinais clássicos associados ao choque séptico (Figura 8).

Para avaliação da função cardiovascular, os animais foram submetidos à pletismografia de cauda, incluindo nessa avaliação o período correspondente ao pré-cirúrgico (valores considerados como basais) e os tempos de 6, 24 e 48 horas. Os animais do grupo CLP apresentaram redução na pressão arterial sistólica basal em todos os tempos avaliados: $130,2 \pm 4,4$ e $88,18 \pm 2,2$ mmHg, para controle e CLP 6 h, respectivamente $130,9 \pm 4$ e $102,1 \pm 0,6$ mmHg; para controle e CLP 24 h respectivamente; e $129,2 \pm 3,8$ e $102,8 \pm 1,6$ mmHg, para controle e CLP 48 h respectivamente. Esses dados caracterizaram o estado de hipotensão, classicamente descrito na sepse e choque séptico, tanto em humanos como em modelos experimentais (Figura 8-A).

Após a avaliação da pressão arterial basal dos animais sobreviventes à cirurgia (CLP 3 furos), utilizando a metodologia de verificação de pressão invasiva através do cateterismo intracardíaco ventricular esquerdo, avaliamos as respostas a agentes vasoconstritores a partir da utilização de fenilefrina 30 nmol/kg pela via endovenosa. Os resultados nos mostraram hiporresponsividade a esse agente nos tempos de 6 e 72 horas após a indução à sepse (~ 50%), enquanto no tempo de 24 horas e nos sobreviventes à sepse (30 dias), não observamos a hiporresponsividade (Figura 8-B). Apesar da hipotensão e da hiporreatividade à fenilefrina, não encontramos alterações significativas na frequência cardíaca nesses grupos.

Avaliando, pela segunda vez uma curva de sobrevivência, construída com 20 animais submetidos à CLP, observamos de forma mais detalhada a mortalidade no período inicial do processo séptico (6, 12, 24 e 48 horas após a CLP). O resultado obtido foi semelhante ao que encontramos durante a escolha do modelo, onde apenas 40% dos animais que passaram pela CLP sobreviveram (Figura 8-C). A partir do período de 72 horas após à CLP não houve mortes nos grupos avaliados, caracterizando esse tempo como o de possível recuperação do processo patológico induzido.

Além da avaliação cardiovascular e da taxa de sobrevivência, desenvolvemos uma ferramenta, a partir do trabalho de Araujo *et al.*, (2012), na qual avaliamos e pontuamos os sinais de sepse no período de até 72 horas. Neste score, a pontuação próxima a zero indica ausência de sinais associados a perdas de funções ou prejuízos de funções, enquanto a pontuação mais alta indica a presença desses sinais. Nas horas iniciais entre 6 e 36 horas, os animais submetidos ao CLP apresentaram pontuação elevada caracterizada pela presença de piloereção, bradicardia, dispneia,

redução da mobilidade e capacidade de exploração ambiental, e diminuição da resposta a estímulos como barulho e toque. Na 48^a hora de avaliação, observamos pontuação menor, até que na 72^a hora a pontuação retorna para valores semelhantes ao basal (Figura 8-D).

Ainda no período inicial da sepse, entre a sexta e 12^a hora, os animais apresentaram hipotermia, caracterizada pela queda na temperatura retal de 2°C, quando comparados com o grupo controle (Figura 08-E). É importante ressaltar que nenhum dos animais sobreviventes (72 horas após a CLP), apresentaram qualquer sinal de sepse, permanecendo indistinguíveis dos animais controle.

4.2 PERFIL HEMATOLÓGICO: DA FASE DE RECUPERAÇÃO À SOBREVIVÊNCIA

No tempo de 72 horas após a CLP, identificado como o período temporal no qual os animais deixavam de apresentar sinais e sintomas característicos da sepse e no período de 30 dias após a CLP - identificado como período de sobrevivência pós-sepse - foram realizadas análises hematológicas no sangue coletado desses animais, cujos resultados foram comparados com seus respectivos grupos controle (Tabela 1).

O grupo 72 horas após a CLP apresentou diminuição no percentual do hematócrito, quando comparado com o grupo controle, e uma queda na porcentagem de monócitos, quando comparado com ambos os grupos, controle e CLP 30 dias. Quando comparados com os grupos controle e CLP 72 horas, os sobreviventes, apresentaram leucocitose acompanhada de aumento do percentual de monócitos, além de trombocitose. Esses dados sugerem o reaparecimento de sinais de processo inflamatório e coagulopatias nos sobreviventes ao insulto séptico.

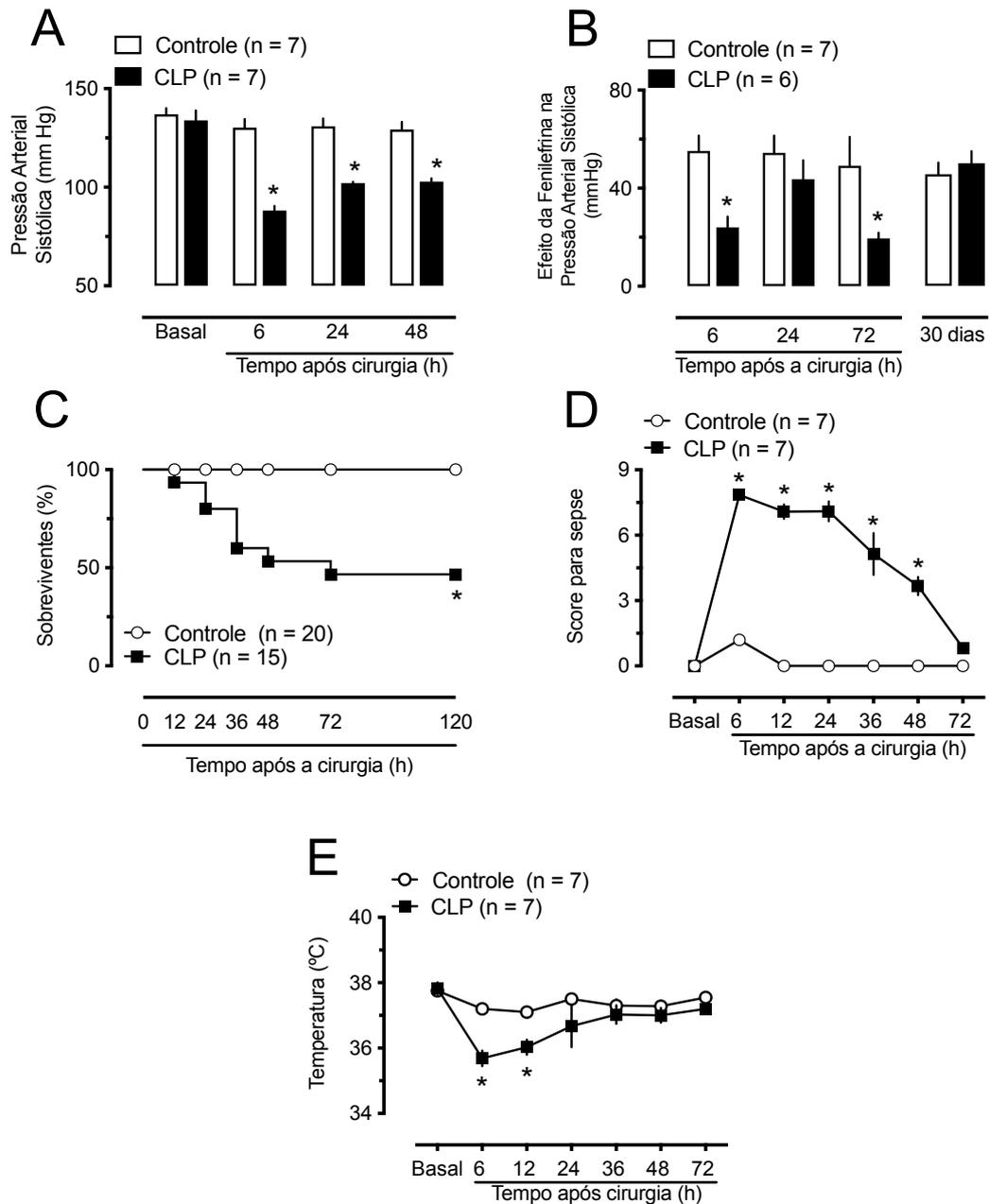


Figura 8: Perfil das alterações sistêmicas provocadas pela indução a sepse através do modelo de CLP. O perfil vascular dos animais CLP (barras pretas) e controle (barras brancas) foram adquiridos a partir da avaliação *in vivo* pela metodologia de pletismografia de cauda e cateterismo pressão-volume intraventricular e estão representados nos gráficos A e B, onde observamos uma hipotensão arterial sistólica no grupo CLP nos tempos de 6, 24 e 48 horas, quando comparados com o grupo controle, e uma hiporresponsividade à fenilefrina nos animais CLP 6 e 72 horas após a CLP, quando comparados com o grupo controle. A taxa de sobrevivência, apresentada no gráfico C, foi realizada a partir do modelo criado por Kaplan-Meier durante 120 horas, onde a letalidade do CLP (quadrado preto) foi superior a 60%, quando comparado com o grupo falso operado (círculo branco). Os animais foram avaliados por 72 horas através do score para sepse, figura D. Também, tiveram sua temperatura retal verificada, gráfico E. Os resultados foram apresentados através da média \pm EPM. Para os experimentos A e B utilizamos a análise estatística ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. Para os gráficos C, D e E a análise estatística utilizada foi o teste de Mantel-Cox, o teste de log-rank, não paramétrico *mann-whitney* e teste *t* de Student, respectivamente. * Indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

Tabela 1: Perfil hematológico dos animais sobreviventes à sepse.

	Controle (n=5)	CLP 72 h (n=5)	CLP 30 d (n=5)
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,6 \pm 0,6	8,2 \pm 0,5	12,4 \pm 1,5*
Linfócitos (%)	65,8 \pm 1,0	63,2 \pm 5,1	60,8 \pm 3,0
Monócitos (%)	14,6 \pm 0,5	11,8 \pm 0,9#	16,0 \pm 0,8*
Granulócitos (%)	19,8 \pm 1,4	18,0 \pm 1,0	23,9 \pm 1,1
Hematócritos (%)	39,2 \pm 1,4	33,4 \pm 0,9*	35,2 \pm 1,1
Hemoglobina (%)	10,2 \pm 0,5	8,8 \pm 0,3	9,6 \pm 0,4
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	788,8 \pm 33,1	819,8 \pm 20,0	1092,2 \pm 53,0*

Os resultados representam a média \pm EPM de seis animais por grupo. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e CLP 30 d, respectivamente.

4.3 EFEITOS DA INDUÇÃO SÉPTICA NA FUNÇÃO DE BOMBEAMENTO DO CORAÇÃO: DA FASE INICIAL À SOBREVIVÊNCIA

A avaliação da frequência cardíaca através do cateter intraventricular não revelou qualquer diferença entre os animais submetidos ao modelo de CLP e os animais controle, nem dos períodos iniciais até sua recuperação (6 h – 72 h), nem nos sobreviventes (15 e 30 dias) (Figura 9-A). Entretanto, dados do cateter intraventricular, obtidos a partir de 30-60 segundos de registro, revelaram que os animais sépticos apresentaram redução do volume sistólico, bem como do débito cardíaco, 6 e 24 horas após a cirurgia (Figura 9B-C), com retorno aos níveis basais em 72 horas, permanecendo inalterados até o 15º dia após a CLP. Contudo, os sobreviventes no 30º dia demonstraram redução de 25 a 40% do volume sistólico e também do débito cardíaco, quando comparados com os grupos controle (Figura 9B-C), caracterizando efeito depressor tardio no bombeamento cardíaco.

Nossos dados também revelaram redução notável do trabalho sistólico dos animais sépticos na sexta e 24ª hora, comparados com os grupos controle (Figura 10-A). Resultados semelhantes foram encontrados para dP/dt_{max} (reduzido no grupo 6 h CLP, Figura 10-B) e fração de ejeção (reduzida 24 h após o CLP; Figura 10-C). É importante ressaltar que o dP/dt_{max} e a fração de ejeção registrados 72 horas e 15 dias após a CLP não diferiram daqueles que encontramos nos animais controle com idades semelhantes.

Os animais CLP 72 h tiveram valores basais para o trabalho sistólico significativamente maior, quando comparados com o seu grupo controle e também com os animais CLP 24 h (Figura 10-A). O trabalho sistólico e a fração de ejeção foram significativamente menores nos animais sobreviventes à sepse (Figuras 10-A e C), sugerindo insuficiência cardíaca do tipo sistólica que ressurgiu após 30 dias do insulto séptico.

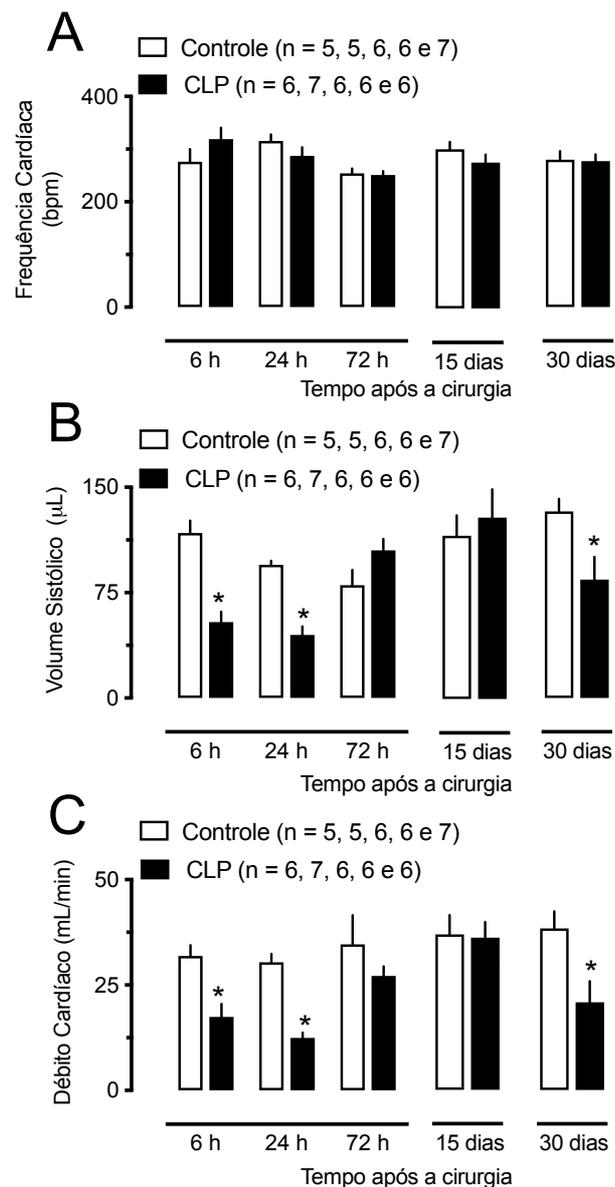


Figura 9: Caracterização do prejuízo no bombeamento cardíaco durante a sepse. Os resultados apresentam parâmetros que avaliam a capacidade de bombeamento do coração, onde o gráfico A representa a frequência cardíaca, a qual permanece inalterada nos grupos CLP e controle, em todos os tempos avaliados. O gráfico B apresenta os resultados do volume sistólico e C os de débito cardíaco, ambos os parâmetros encontraram-se reduzidos nos animais CLP nos tempos de 6 e 24 horas e 30 dias após a CLP (barras pretas) quando comparados com o grupo controle (barras brancas). Os resultados foram obtidos através da metodologia, *in vivo*, após a cateterização cardíaca pressão-volume intraventricular esquerdo. As barras brancas representaram os animais controles e as barras pretas o grupo CLP. Na legenda, em parênteses, encontramos o n para cada grupo (6, 24 e 72, 15 e 30 dias, respectivamente). Os resultados foram representados através da média \pm EPM. A análise estatística foi feita de duas maneiras, comparando o parâmetro basal com seu respectivo controle utilizando o teste *t* de Student, e comparando a resposta entre os diferentes tempos de CLP utilizando a ANOVA de duas vias seguidas pelo *post hoc* de Bonferroni. * Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

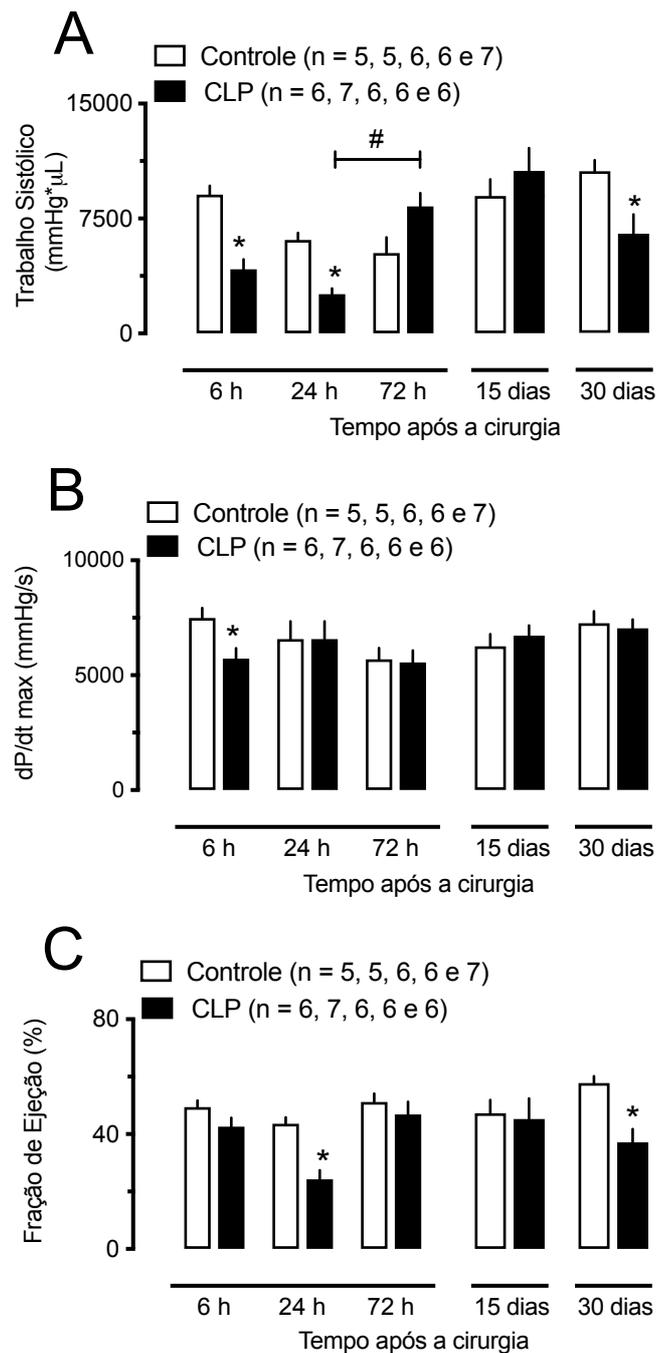


Figura 10: Alterações cardíacas durante a fase sistólica, durante e após a sepse induzida pelo CLP. Em A observamos o trabalho sistólico, diminuído nos tempos de 6 e 24 horas, e 30 dias após a CLP (comparado com o grupo controle). No gráfico B parâmetro dP/dt máximo reduzido apenas na primeira hora (6 horas após a CLP), em C a fração de ejeção, com redução observada nas 24 horas e 30 dias após a indução à sepse, quando comparado com os animais controle. Os resultados foram adquiridos a partir da metodologia *in vivo*, através da inserção do cateter de condutância pressão-volume ventricular. Os dados foram representados a partir da média \pm EPM. Na legenda, em parênteses, encontramos o n para cada grupo (6, 24 e 72, 15 e 30 dias, respectivamente). A análise estatística foi feita de duas maneiras, comparando o parâmetro basal com seu respectivo controle, utilizando o teste *t* de Student, e comparando a resposta entre os diferentes tempos de CLP, utilizando a ANOVA de duas vias seguidas pelo *post hoc* de Bonferroni. * Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # indica $p < 0,05$ em relação aos grupos CLP.

A análise hemodinâmica ventricular esquerda revelou que o volume diastólico final basal (Figura 11-A), dV/dt_{max} (Figura 11-C) e Tau (Figura 11-D) estavam diminuídos nas primeiras horas após a indução à sepse, mas nenhum destes índices diferiram dos animais controle nas 72 horas ou 15 dias após a cirurgia. Reduções dos valores basais do volume diastólico final (Figura 11-A) e o prolongamento da Tau (Figura 11-D) foram registrados nos animais sobreviventes à sepse (CLP 30 d), quando comparados com animais controle. Além disso, a pressão diastólica final encontrou-se aumentada 30 dias após o insulto séptico, apesar de valores inalterados terem sido encontrados em períodos iniciais e de recuperação (6 h – 72 h) e nos

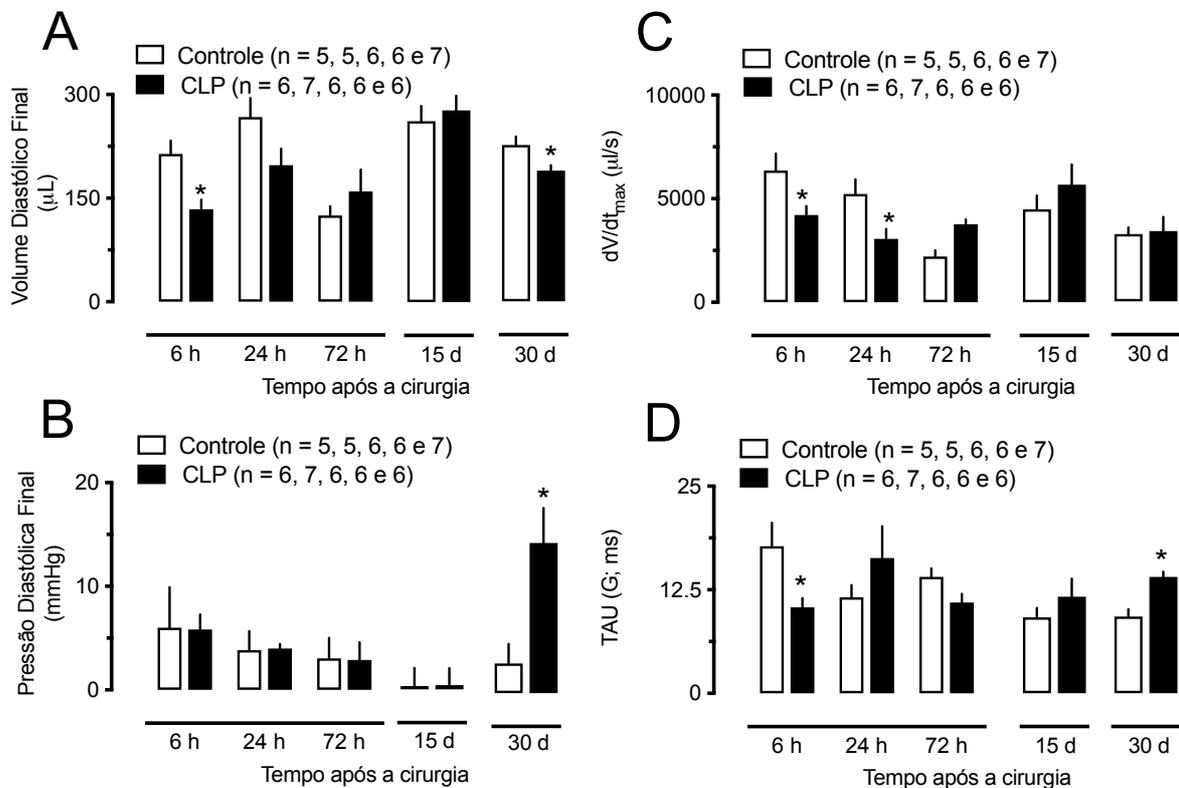


Figura 11: Alterações cardíacas durante a fase diastólica, durante e após a sepse induzida pelo CLP. Em A o volume diastólico final o qual apresentou-se reduzido na hora inicial e nos sobreviventes (6 horas e 30 dias após a CLP, respectivamente). Em B observamos a elevação da pressão diastólica final no grupo de sobreviventes 30 dias após a CLP; C a redução da derivada de volume máximo por tempo nas horas iniciais da sepse (6 e 24 h), com retorno a valores basais nos animais recuperados e sobreviventes (72 h, 15 e 30 d respectivamente); D observamos o tempo de relaxamento isovolumétrico (TAU) permanece reduzido 6 horas após a CLP, mas aumentado nos animais sobreviventes à sepse (CLP 30 d). Os dados foram representados a partir da média \pm EPM. Na legenda, em parênteses o n para cada grupo (6, 24 e 72 h, 15 e 30 dias, respectivamente). A análise estatística foi feita de duas maneiras, comparando o parâmetro basal com seu respectivo controle, utilizando o teste *t* de Student, e comparando a resposta entre os diferentes tempos de CLP, utilizando a ANOVA de duas vias seguidas pelo *post hoc* de Bonferroni * Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

sobreviventes 15 d após a CLP (Figura 11-B). Esses resultados sugerem a incapacidade de relaxamento ventricular, ou seja, uma disfunção do tipo diastólica.

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise dos parâmetros cardíacos focando apenas nos sobreviventes 30 dias após a CLP. A partir desses dados observamos que esses animais apresentam disfunção cardíaca do tipo sistólica, compreendida pelo prejuízo na capacidade de manter uma fração de ejeção e um trabalho sistólico adequado, e uma disfunção cardíaca do tipo diastólica, representada pelo aumento da velocidade de relaxamento isovolumétrico (TAU) e da pressão diastólica final, resultando na diminuição do volume diastólico final. Esse conjunto de alterações acabaram por reduzir o volume de sangue ejetado pelo coração, o débito cardíaco.

Tabela 2: Insuficiência cardíaca do tipo sistólica e diastólica encontradas nos animais sobreviventes à sepse 30 dias após a CLP.

	Controle (n=7)	CLP 30 Dias (n=6)
Frequência cardíaca (BPM)	232,1 ± 53,5	286,6 ± 12,4
Volume sistólico (µL)	133,2 ± 8,8	84,5 ± 16,2*
Débito cardíaco (mL/Min)	38,5 ± 4,1	20,8 ± 5,0*
Trabalho sistólico (mmHg*µL)	10551 ± 735,6	6481 ± 1252*
dP/dt max (mmHg/s)	7266 ± 522,9	7045 ± 387,9
Fração de ejeção (%)	60,8 ± 2,0	37,1 ± 4,6*
Volume diastólico final (µL)	226,6 ± 12,0	189,3 ± 7,7*
Pressão diastólica final (mmHg)	2,8 ± 5,0	14,5 ± 8,2*
dV/dt max (µL/s)	3254 ± 315,2	3395 ± 692,5
TAU (G;ms)	9,2 ± 0,8	14,0 ± 0,6*

Dados expressos em média ± EPM de 6 a 8 animais por grupo (CLP e controle respectivamente). A análise estatística foi feita utilizando o teste *t* de *Student*. * Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Observamos ainda que os parâmetros basais da elastância arterial (EA) e pressão intraventricular (Figura 12-A e C) encontram-se aumentados em animais sobreviventes à sepse (comparados ao grupo controle); este parâmetro é diretamente relacionado à pressão exercida na câmara ventricular esquerda para vencer a resistência aórtica, a pós carga. Também encontramos diminuição do volume intraventricular basal (Figura 12-B) nos animais sobreviventes à sepse quando comparados com o grupo controle. O volume intraventricular reduzido suporta a nossa ideia de que o coração segue com sua capacidade de relaxamento comprometida, já que, com menor área o ventrículo diminui sua capacidade em receber sangue. Juntamente com as figuras observamos o registro da curva pressão volume, de ambos os grupos, onde essas disfunções estão destacadas em suas linhas ordenadas e abscissas (Figura 12-D).

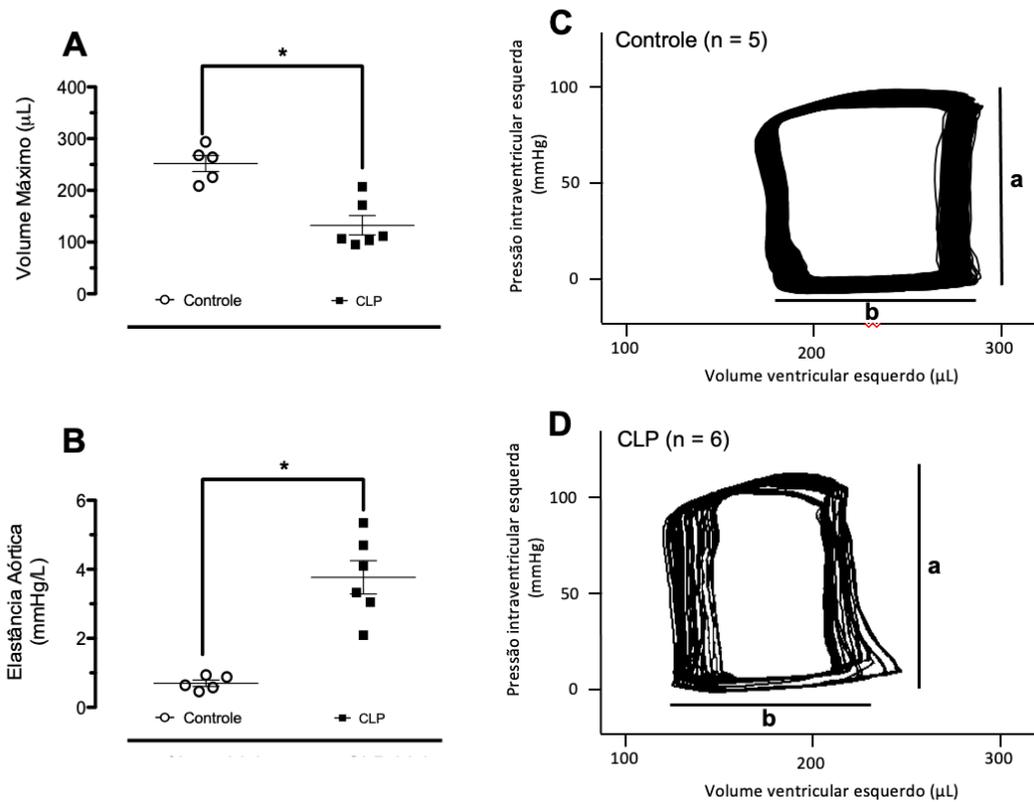


Figura 12: Alterações de resistência aórtica e volume ventricular esquerdo em animais sobreviventes à sepse. Em A observamos uma redução do volume máximo, do ventrículo esquerdo e B o aumento dos valores basais da elastância aórtica, nos animais sobreviventes à sepse (quadrado preto) quando comparados com o grupo controle (círculo branco). Nas Figuras C e D observamos o registro típico contendo a curva pressão volume ventricular dos animais controle e sobreviventes à sepse 30 dias após o CLP. **a** representa o aumento da pressão intraventricular e **b** o volume ventricular. A análise estatística foi feita separadamente utilizando o teste *t* de Student. O n experimental encontra-se na legenda do registro típico. O * Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.4 CONTRATILIDADE REDUZIDA EM CORAÇÕES DE RATOS SOBREVIVENTES À SEPSE SUBMETIDOS AO MODELO DE LANGENDORFF

A utilização do método de coração isolado e perfundido nos deu a possibilidade de estudar os mecanismos fisiológicos do coração sem a ação do sistema nervoso central e a ação hormonal de outros sistemas. Os corações isolados de animais sobreviventes à sepse, 30 dias após a CLP, mostraram perda significativa na capacidade de gerar força contrátil durante os batimentos cardíacos (Figura 13-A), o que já foi visto na avaliação *in vivo*. Somada à deficiência contrátil, os animais CLP 30 d apresentaram redução na pressão de perfusão coronariana (Figura 13-B). No entanto, não foram observadas diferenças significativas na frequência de batimentos cardíacos entre os grupos (Figura 13-C).

Também analisamos o tempo necessário para esse coração gerar um ciclo cardíaco, ou seja, período que envolve o relaxamento e a contração cardíaca. Quando comparados com o grupo controle, observamos um tempo maior para gerar um ciclo cardíaco nos animais sobreviventes à sepse (Figuras 13-D), e que esse aumento se deu por uma fase de relaxamento prolongada (diástole) (Figura 13-E), já que a fase contrátil (sístole) se encontrou sem alterações (Figura 13-F).

4.5 REDUÇÃO DAS RESPOSTAS CARDÍACAS ÀS DROGAS VASOATIVAS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Através do cateter intraventricular, ao registrar o efeito da dobutamina 30 nmol/kg na pressão intraventricular, observamos resposta significativamente reduzida nos ratos sobreviventes 30 dias após a indução da sepse (Figura 14-A). Este efeito também pode ser visto na figura que representa a curva pressão volume ventricular na sua forma basal e sobreposta a outra curva representando o efeito da dobutamina (registro típico – Figura 14-D). A resposta dos animais controle à dobutamina provoca aumento dos níveis de pressão ventricular (eixo das ordenadas) e volume ventricular (eixo das abscissas); entretanto, o mesmo não ocorre nos animais sobreviventes à

sepsis (Figura 14-D), caracterizando a resposta reduzida a este agente inotrópico positivo.

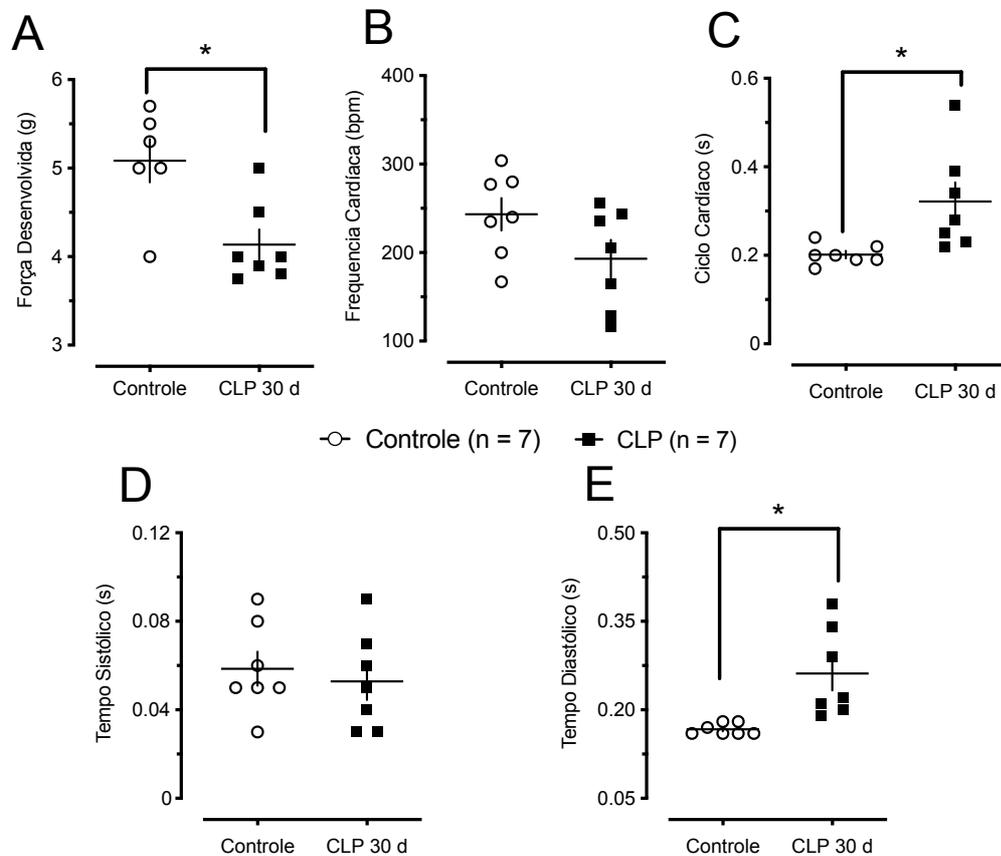


Figura 13: Alterações cardíacas de animais sobreviventes à sepsis pela metodologia de Langendorff. Diminuição da força de tensão gerada pelo coração nos animais sobreviventes (a); frequência cardíaca inalterada (b); maior tempo para gerar o ciclo cardíaco nos sobreviventes (c); tempo sistólico inalterado (d); tempo diastólico maior para o grupo sobrevivente (e). Os resultados apresentados foram obtidos comparando-se os grupos controle e CLP 30 d. Os dados representam a média \pm EPM. A análise estatística utilizada foi o teste *t* de Student. * Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Através da técnica de Langendorff, comparamos a resposta do coração de ratos sobreviventes à sepsis (30 dias após a CLP) com a de ratos controle durante a utilização da dobutamina nas doses de 3, 10 e 30 nmol (Figuras 14-B e 14-C). Na avaliação do delta da resposta da dobutamina sobre a tensão cardíaca, observamos aumento no grupo controle em todas as doses, mas não no grupo CLP 30 dias, na dose de 10 nmol (Figura 14-B). Apesar da diferença no delta, a curva sobre a área da resposta gerada pela dobutamina não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 14-C).

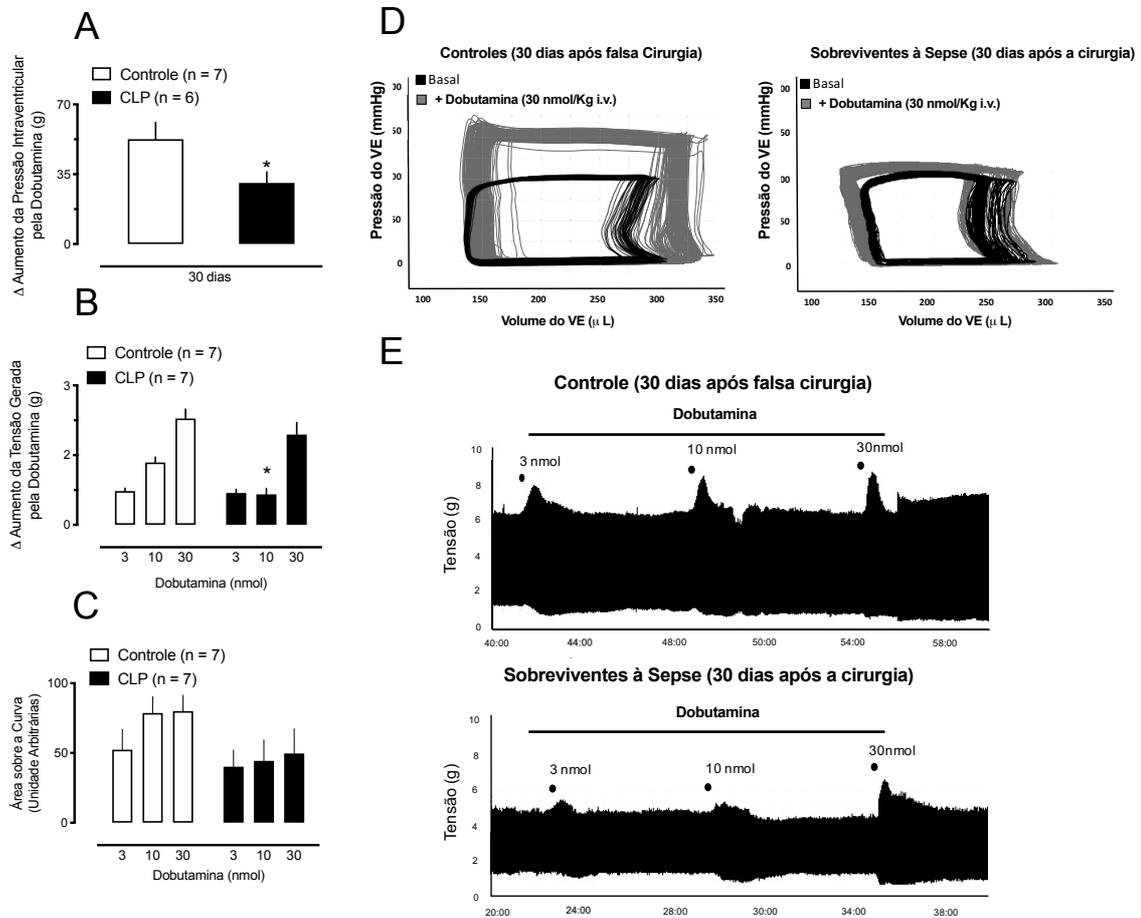


Figura 14: Hiporresponsividade para a dobutamina em corações de animais sobreviventes à sepse. Observamos uma redução da resposta para a dobutamina, na pressão intraventricular (a) e no delta da força de tensão gerada, na dose de 10 nmol (b) nos animais sobreviventes à sepse, mas não, na área sobre a curva (c), comparados com o grupo controle. No registro típico da curva pressão-volume ventricular (d), os animais sobreviventes apresentam poucas alterações na curva pressão-volume, após a administração intravenosa de dobutamina; no registro típico da tensão gerada em resposta a dobutamina (e), encontramos uma redução no pico da curva resposta, para a dose de 10 nmol, ambos comparados com o grupo controle. Os dados representam a média \pm EPM. A análise estatística foi feita utilizando o teste *t* de Student para Figura A e ANOVA de duas vias seguidas pelo *post hoc* de Bonferroni nas figuras B e C. * Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Analisando o registro típico da tensão gerada pelo ventrículo esquerdo (Figura 14-D), encontramos uma tensão basal notavelmente mais alta em animais do grupo controle quando comparados com animais sobreviventes (Figura 14-E). Além disso,

também pode ser observada a redução no pico do efeito da dobutamina na dose de 10 nmol nos animais sobreviventes, quando comparados com o grupo controle (Figuras 13-B e E). Esses dados nos sugerem um prejuízo relacionado à capacidade dos corações de animais sobreviventes à sepse em gerar aumento na sua força contrátil mediante a utilização de um agente farmacológico.

Na Tabela 3 observamos os efeitos da dobutamina em outros parâmetros analisados e em diferentes tempos. As respostas à dobutamina seguem reduzidas na 6ª hora após a CLP, nos parâmetros de trabalho sistólico ($4092 \pm 397,7$ e $1551 \pm 531,3$ mmHg* μ L grupo controle e CLP 6 h, respectivamente), e de variação da pressão pela derivação de tempo máximo ($7466 \pm 922,1$ e $4117 \pm 868,9$ mmHg/s, grupo controle e CLP 6 h, respectivamente). Entretanto, neste período inicial a resposta da fração de ejeção à dobutamina apresentou-se maior quando comparada com o grupo controle ($-7,0 \pm 3,4$ e $2,1 \pm 2,5\%$, grupo controle e CLP 6 h, respectivamente).

Na 24ª hora após a indução da sepse (grupo CLP 24 h) também encontramos aumento da resposta à dobutamina na fração de ejeção (-6.6 ± 2.3 e $2.5 \pm 3.0\%$, grupo controle e CLP 24 h, respectivamente), sem redução da resposta aos parâmetros de pressão, mas com redução no volume diastólico final ($14,1 \pm 3,5$ e $3,2 \pm 3,6$ μ L, grupo controle e CLP 24 h, respectivamente) e no parâmetro de relaxamento isovolumétrico (TAU; 4.0 ± 0.7 e 2.0 ± 0.3 ms, grupo controle e CLP 24 h, respectivamente). No período que caracterizamos como processo de completa recuperação do processo séptico (CLP 72 h), os animais parecem recuperar a capacidade de responder à dobutamina, exceto, na variação da pressão pela derivação de tempo, em que ainda apresenta redução da resposta (Tabela 3).

Uma redução na resposta à dobutamina semelhante as da fase inicial também foi encontrada no grupo CLP 30 dias. Esse achado é caracterizado pela baixa resposta para o aumento do trabalho sistólico (5032 ± 1271 e $1805 \pm 466,3$ mmHg* μ L, para controles e sobreviventes, respectivamente), resposta diminuída na fração de ejeção ($20,3 \pm 3,7$ e $6,8 \pm 2,1\%$, para controle e sobreviventes, respectivamente), e na variação da pressão pela derivação do tempo máximo (dP/dt_{max} ; 7277 ± 1159 e 2445 ± 1328 mmHg/s para controles e sobreviventes, respectivamente). Esses parâmetros são dependentes da força de contração, sugerindo que os animais do grupo CLP 30 dias, além de apresentarem alterações na função cardíaca, também apresentam baixa resposta inotrópica positiva à dobutamina, dados esses contidos na Tabela 3.

Tabela 3: Delta dos efeitos da dobutamina sobre a bomba cardíaca

Parâmetros	Grupos							
	6 h		24 h		72 h		S 30 d	
	Controle (n = 5)	CLP (n = 6)	Controle (n = 5)	CLP (n = 7)	Controle (n = 6)	CLP (n = 6)	Controle (n = 7)	CLP (n = 6)
<i>FE (%)</i>	-7,0 ± 3,4	2,1 ± 2,5*	-6,6 ± 2,3	2,5 ± 3,0*	-7,0 ± 4,2	-2,0 ± 2,8	20,3 ± 3,7	6,8 ± 2,1*
<i>VS (μL)</i>	7,6 ± 6,1	12,5 ± 3,7	4,5 ± 6,7	14,9 ± 4,7	15,5 ± 3,9	12,1 ± 2,8	24,4 ± 14,4	10,0 ± 5,5
<i>DC (ml/min)</i>	3,7 ± 1,8	5,1 ± 3,6	- 2,0 ± 1,8	1,8 ± 2,3	-1,8 ± 3,4	2,5 ± 1,8	4,7 ± 1,3	7,7 ± 2,3
<i>TS (mmHg*μL)</i>	4092 ± 397,7	1551 ± 531,3*	2506 ± 721	3649 ± 661,2	3423 ± 1016	1996 ± 580,1	5032 ± 1271	1805 ± 466,3*
<i>dP/dt_{max} (mmHg/s)</i>	7466 ± 922,1	4117 ± 868,9*	7863 ± 792,8	5915 ± 804,1	4931 ± 518,9	2880 ± 709,6*	7277 ± 1159	2445 ± 1328*
<i>FC (bpm)</i>	52,1 ± 13,8	21,2 ± 35,2	92,7 ± 39,3	72,6 ± 25,6	44,8 ± 6,6	31,5 ± 5,3	125,8 ± 68,97	119,9 ± 34,29
<i>VDF (μL)</i>	18,8 ± 7,8	10,1 ± 4,2	14,1 ± 3,5	3,2 ± 3,6*	11,2 ± 3,7	2,8 ± 3,2	20,7 ± 6,9	12,1 ± 4,3
<i>PDF (mmHg)</i>	4,1 ± 1,7	0,4 ± 2,4	5,9 ± 2,7	3,6 ± 1,6	1,4 ± 2,6	-0,1 ± 0,2	0,3 ± 1,1	8,2 ± 3,1*
<i>dV/dt_{max} (μL/s)</i>	71,8 ± 1119	560,3 ± 308,7	1514 ± 645,1	588,2 ± 173,5	312,3 ± 632,8	3,1 ± 551,2	901 ± 1269	598,7 ± 267,9
<i>TAU (ms)</i>	-1,0 ± 2,1	-0,6 ± 0,6	4,0 ± 0,7	2,0 ± 0,3*	0,4 ± 0,8	0,4 ± 0,8	3,8 ± 1,0	4,0 ± 1,0

FE – fração de ejeção, VS – volume sistólico, DC – débito cardíaco, TS – trabalho sistólico, dP/dTmax – derivada da pressão pelo tempo máximo, FC – frequência cardíaca, VDF – volume diastólico final, PDF – pressão diastólica final e dV/dtmax – derivada do volume pelo tempo máximo. Os resultados representam a média ± EPM. A análise utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indicam P < 0,05.

Ainda na Tabela 3 observa-se que a pressão diastólica final parece não responder à dobutamina em animais sobreviventes, quando comparados com seus grupos controle ($8,2 \pm 3,1$ e $0,3 \pm 1,1$ mmHg, respectivamente), enquanto os parâmetros dependentes de volume (VS, DC, VDF e dV/dt_{max}) não demonstraram diferença de resposta à dobutamina entre os grupos.

Embora o agente farmacológico fenilefrina não seja descrito como agente inotrópico positivo, sua ação foi avaliada a fim de observar a resposta cardíaca às alterações pressóricas (dose de 30 nmol pela via endovenosa). Observou-se que na fase inicial, 6 horas após a CLP, o aumento pressórico induzido pela fenilefrina foi capaz de influenciar mudanças na pré- e pós-carga cardíaca, resultando em melhora hemodinâmica que pode ser evidenciada pelo aumento do volume sistólico, débito cardíaco, trabalho sistólico, frequência cardíaca e pressão diastólica final, quando comparados com o grupo controle (Tabela 4).

Já na avaliação 24 h após a CLP, os efeitos positivos da fenilefrina sobre a pré- e pós-carga cardíaca parecem não gerar respostas cardíacas diferentes nos parâmetros avaliados, quando comparados com seu grupo controle. Entretanto, nas 72 horas após a CLP, os animais considerados recuperados apresentaram volume diastólico final reduzido após a injeção de fenilefrina, comparados com o grupo controle. Este resultado sugere que, apesar dos parâmetros cardíacos terem voltado aos níveis basais, comparáveis aos do grupo controle e os animais sépticos (6, 24 horas e 30 dias após a CLP) (Tabela 4).

Nos animais sobreviventes ao processo séptico (30 d após CLP), as respostas cardíacas às alterações hemodinâmicas provocadas pela fenilefrina foram reduzidas nos parâmetros fração de ejeção e volume diastólico final ($7,5 \pm 1,9$ e $2,8 \pm 1,8\%$; $55,5 \pm 12,7$ e $22,6 \pm 2,9$ μ L, grupos controle e sobreviventes, respectivamente). Este resultado sugere que apesar da melhora pressórica sistêmica, caracterizada pelo retorno da resposta a fenilefrina para seus valores basais (Figura 8-B), esses sobreviventes não conseguem reaver a capacidade ejetora, ou seja, a ação da fenilefrina na pré e pós-carga cardíaca não influencia no desempenho cardíaco, muito provavelmente porque parte dessas alterações é independente das condições pressóricas sistêmicas desses animais.

Tabela 4: Delta das alterações cardíacas após a utilização de fenilefrina.

Parâmetros	Grupos							
	6 h		24 h		72 h		S 30 d	
	Controle (n = 5)	CLP (n = 6)	Controle (n = 5)	CLP (n = 7)	Controle (n = 6)	CLP (n = 6)	Controle (n = 7)	CLP (n = 6)
<i>FE (%)</i>	-1,9 ± 4,3	8,1 ± 4,0	-4,3 ± 7,2	1,1 ± 3,1	8,2 ± 11,1	-0,5 ± 5,8	7,5 ± 1,9	2,8 ± 1,8*
<i>VS (μL)</i>	-7,3 ± 4,4	9,4 ± 2,5*	-22,3 ± 14,0	1,7 ± 6,2	3,3 ± 18,6	-1,2 ± 8,9	10,4 ± 9,6	25,0 ± 14,3
<i>DC (ml/min)</i>	-1,8 ± 1,6	8,4 ± 4,1*	-5,8 ± 4,7	3,4 ± 3,3	-0,4 ± 4,8	0,5 ± 2,1	5,4 ± 4,8	5,8 ± 2,8
<i>TS (mmHg*μL)</i>	484,1 ± 166,5	1949 ± 533*	247,3 ± 884,2,	1736 ± 541	1815 ± 560,3	1174 ± 227,4	2493 ± 1264	4260 ± 1919
<i>dP/dt_{max} (mmHg/s)</i>	2003 ± 641,2	1374 ± 508	2312 ± 1203	1324 ± 262,9	-1,4 ± 12,3	-0,5 ± 5,8	2718 ± 1292	1603 ± 1096
<i>FC (bpm)</i>	54,4 ± 10,4	11,6 ± 8,6*	21,9 ± 31,8	45 ± 24,2	20,9 ± 12,3	11,4 ± 3,9	106,9 ± 52,78	137,2 ± 57,56
<i>VDF (μL)</i>	30,4 ± 4,3	20,1 ± 6,6	38,9 ± 10,2	9,7 ± 11,1	53,1 ± 9,8	21,4 ± 3,4*	55,5 ± 12,7	22,6 ± 2,9*
<i>PDF (mmHg)</i>	9 ± 2,5	1,5 ± 0,3*	15,3 ± 6,3	3,3 ± 1,5	22,1 ± 18,2	17,3 ± 10,1	10,1 ± 2,8	11,1 ± 1,4
<i>dV/dt_{max} (μL/s)</i>	1187 ± 266,1	1374 ± 508	1270,5 ± 180,1	1093 ± 426,3	633,7 ± 263,8	1074 ± 477,7	1162 ± 277,2	1425 ± 871,3
<i>TAU (ms)</i>	2,7 ± 1,7	0,5 ± 0,2	4,1 ± 2,8	-0,1 ± 2,1	2 ± 0,1	1,9 ± 0,6	2,5 ± 1,1	1,3 ± 2,6

FE – fração de ejeção, VS – volume sistólico, DC – débito cardíaco, TS – trabalho sistólico, dP/dTmax – derivada da pressão pelo tempo máximo, FC – frequência cardíaca, VDF – volume diastólico final, PDF – pressão diastólica final e dV/dtmax – derivada do volume pelo tempo máximo. Os resultados representam a média ± EPM. A análise utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indicam P < 0,05.

4.6 PARTICIPAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA NOS SOBREVIVENTES À SEPSE

Em relação aos marcadores biológicos de estresse oxidativo, os resultados revelaram aumento significativo nos níveis de GSH, MPO e NAG (54%, 400% e 50%, respectivamente) nos animais sobreviventes 30 dias após a cirurgia de CLP (Figuras 15-A, 15-B e 15-C, respectivamente). Além disso, as Figuras 15-D e 15-E apontaram redução das atividades da SOD e da GST (64% e 23%, respectivamente) e níveis inalterados de LOOH (Figura 15-F), nos grupos 72 horas e 30 dias após a cirurgia de CLP.

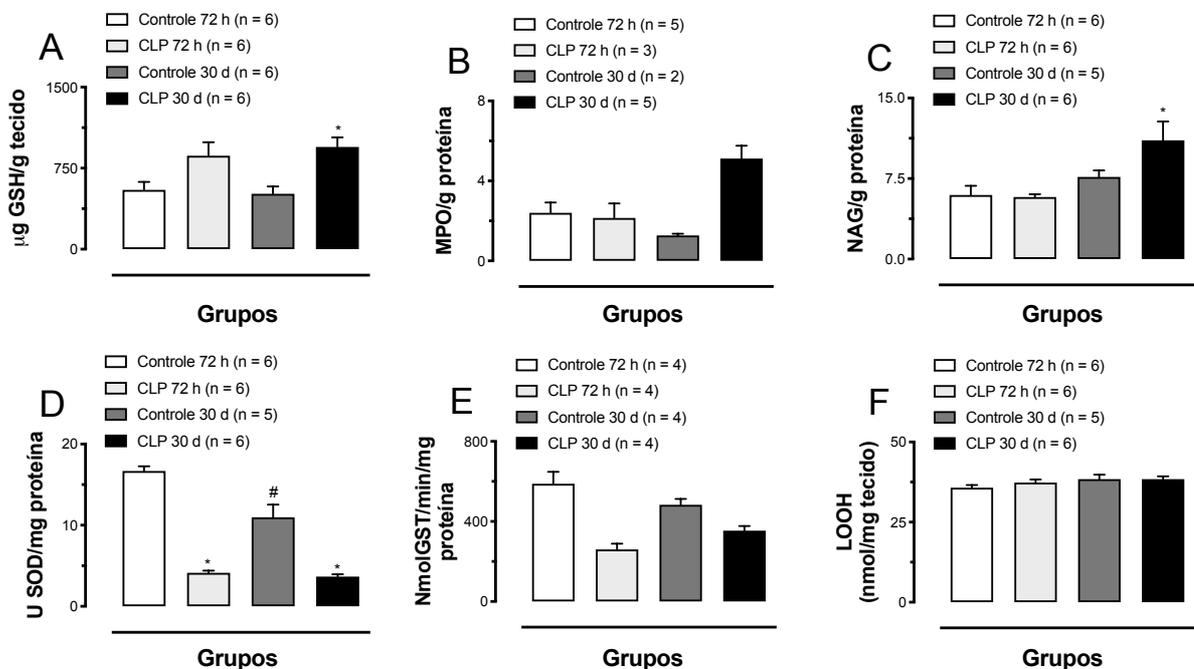


Figura 15: Prejuízo no balanço oxidativo durante o processo de insuficiência cardíaca em animais sobreviventes à sepse. Os resultados apresentam os marcadores biológicos quantificados a partir dos homogenatos ventriculares de animais. Observamos níveis elevados de glutatona (a), mieloperoxidase (b) e n-acetil-glucosamina (c), nos animais sobreviventes à sepse 30 dias após a CLP; níveis reduzidos da superóxido dismutase (d) e glutatona-s-transferase (e) em animais CLP 72 horas e 30 dias após a CLP; e níveis inalterados de hiperóxidos lipídicos (f). Os resultados foram representados pela média \pm EPM. Os resultados contam com diferente n em relação aos grupos. A análise estatística utilizada foi ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni, exceto para os grupos com n inferior a 5 animais. * Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, ** indica $p < 0,01$ e # indica $p < 0,05$ em relação aos grupos controle e CLP.

4.7 PESO SECO E MOLHADO DOS CORAÇÕES E PULMÕES COLETADOS DE ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE.

Após a análise dos parâmetros cardíacos e coleta do sangue para avaliação do perfil hematológico, os animais controles e CLP, dos grupos 6, 24, 72 horas e 30 dias, tiveram seus corações e pulmões retirados e pesados enquanto molhados e secos (após passarem pela estufa). O peso molhado dos corações de animais sépticos não diferiu entre os grupos (Figura 16-A).

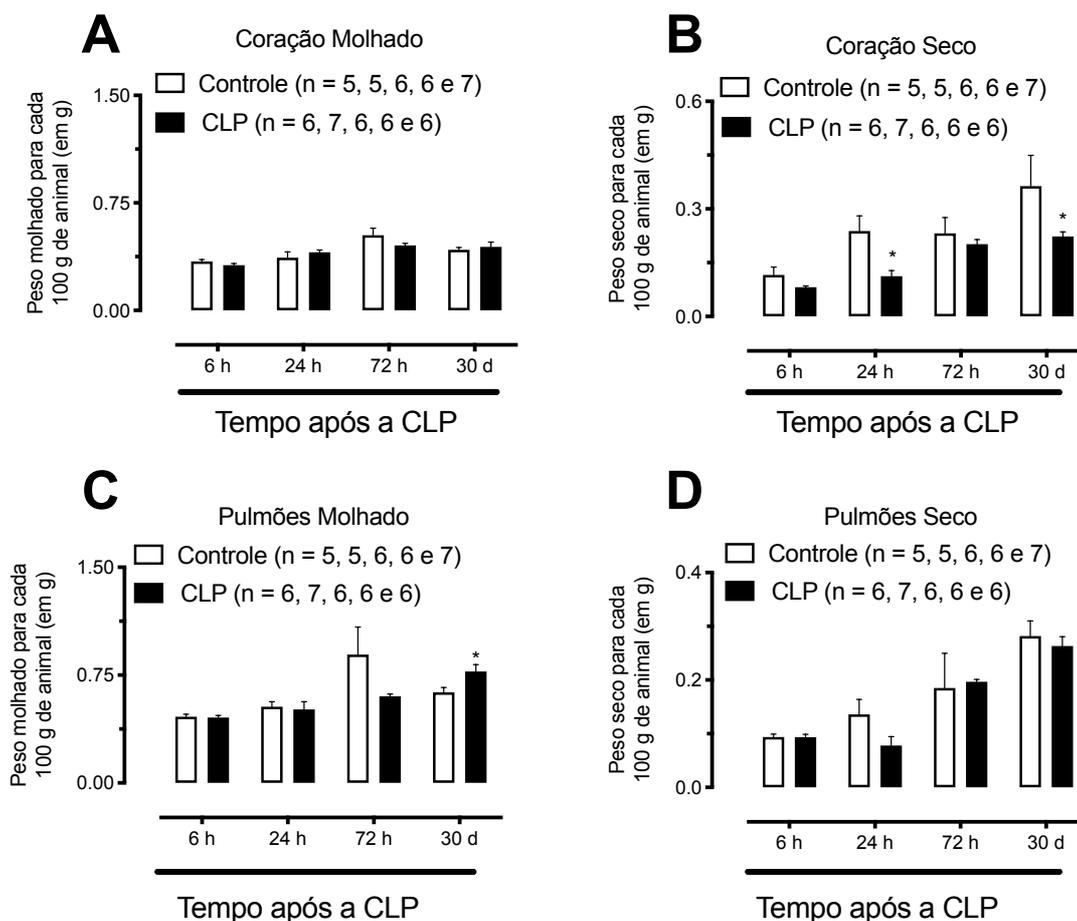


Figura 16: Alterações no peso seco e molhado de corações e pulmões de animais após a CLP. As barras brancas correspondem aos grupos controle e as barras pretas ao CLP. As figuras A e B representam o coração em seu peso molhado e seco, com redução do peso seco nos animais CLP 24 horas e 30 dias após a cirurgia. Em C e D observamos os resultados quanto ao peso dos pulmões molhados e secos, com aumento do peso molhado apenas nos sobreviventes à sepse, 30 dias após a CLP. Os resultados representam a média \pm EPM. A análise estatística foi feita separadamente (comparando com seu respectivo controle) utilizando o *test* de *t* de *Student*. * Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Entretanto, quando comparamos o peso seco de animais sépticos nas 24 horas e 30 dias após a CLP, observamos redução significativa no coração, quando comparados com o grupo controle (Figura 16-B). Por outro lado, não encontramos diferença entre o peso seco dos pulmões dos animais submetidos ao modelo de sepse, quando comparado ao dos animais dos respectivos grupos controle (Figura 16-D). Porém, observamos que o peso molhado dos pulmões dos animais sobreviventes à sepse (grupo CLP 30 dias) encontrava-se significativamente maior do que os valores registrados para os pulmões (peso molhado) dos animais do respectivo grupo controle (Figura 16-C).

5 DISCUSSÃO

Atualmente, temos como diagnóstico padrão ouro para sepse além das variáveis clínicas, as laboratoriais, tais como: prejuízo no perfil hemodinâmico, prejuízo da perfusão tecidual, variáveis no padrão do perfil hematológico e variável de disfunção orgânica. Esses elementos são essenciais para um diagnóstico precoce, em uma doença onde cada hora de atraso para chegar ao seu diagnóstico representa um aumento na mortalidade dos pacientes (DELLINGER, *et al.*, 2013; PRUCHA, BELLINGAN e ZAZULA, 2015).

Em estudos da sepse a partir de modelos projetados em animais, também é possível avaliar os sinais característicos da doença. Nessa avaliação, quanto maior a quantidade de sinais apresentados, maior a gravidade (ARAUJO *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2016). Durante a aplicação da escala visual de score para sepse, observamos que a pontuação nas primeiras 36 horas ultrapassa os seis pontos, caracterizando alterações orgânicas importante durante a fase inicial. Os principais achados foram alterações motoras, alterações na frequência respiratória, esforço respiratório e presença de porfirina.

Sabendo que a redução da pressão arterial ocorre durante o processo séptico, e que também é considerada uma das principais disfunções orgânicas encontradas durante a sepse, sendo identificada a partir da queda no valor da pressão sistólica sanguínea, maior que 40 mmHg, comparada com o basal, ou valores inferiores a 100 mmHg (SINGER *et al.*, 2016; VALLABHANJOSYULA *et al.*, 2018), realizamos verificação da pressão sistólica através da plestismógrafo de cauda. Observamos que nas horas iniciais do insulto séptico (Figura 08-B), os animais encontram-se hipotensos, com uma queda da pressão arterial sistólica de 44 mmHg, quando comparados com os valores basais desses mesmos animais antes do processo de indução à sepse, e valores de pressão sistólica inferiores a 100 mmHg nos três tempos verificados após a CLP (6, 24 e 48 h) ou seja, esses animais apresentam, também, prejuízo para manter valores pressóricos ideais para a manutenção da perfusão sanguínea.

Essas alterações locais e sistêmicas provocadas pela sepse parecem comprometer o tônus da musculatura lisa vascular que, juntamente com o choque

hipovolêmico, é capaz de gerar perda da capacidade regulatória da microcirculação (SIMPSON, LAMONTAGNE e SHANKAR-HARI, 2017). A terapia de reposição volêmica e resgate hemodinâmico tem objetivo de corrigir as variações hemodinâmicas, melhorando a perfusão e a oxigenação tecidual (STURM *et al.*, 2016). Entretanto, em nosso trabalho mesmo com a reposição volêmica não obtivemos valores pressóricos considerados fisiologicamente adequados.

Além da hipotensão, no decorrer do processo séptico, nos tempos de 6 e 72 horas após a CLP, encontramos uma hiporreatividade vascular à fenilefrina. Um dos fatores importantes que contribui para o agravamento do choque séptico é a ausência de respostas a agentes vasoconstritores. Durante esta síndrome a endotoxemia induz a produção de mediadores inflamatórios, seguido por vasoplegia e diminuição da contratilidade cardíaca. Na prática clínica, verificamos a queda da resistência vascular sistêmica através da resposta do vaso aos agentes vasoconstritores, ou seja, a dosagem necessária deste agente para manter a pressão arterial média dentro dos limites fisiológicos. Uma resposta diminuída, ou ausente, a esses agentes sugere uma deficiência da resposta vascular (LEVY *et al.*, 2018).

Para o choque séptico, inúmeras publicações envolvendo estudos em humanos e não humanos trazem a hiporresponsividade vascular a agentes vasopressores como uma das principais características desse estado patológico (DA SILVA-SANTOS, TERLUK e ASSREUY, 2002; LAMIA, CHEMLA, RICHARD e TUBOUL, 2005; FERNANDES e ASSREUY, 2008; KIMMOUN, DUCROCQ e LEVY, 2013), o que vem ao encontro dos nossos achados, nos quais os animais sépticos apresentaram uma diminuição da resposta vascular a agentes vasopressores até 43% menor, quando comparada com seus respectivos grupos controle. Nossos resultados caracterizam essa disfunção vascular clássica durante a sepse, fazendo com que seja possível afirmar que esses animais desenvolveram choque séptico durante os tempos avaliados.

Além da manutenção da homeostasia vascular, a termorregulação é fundamental para todos os mamíferos. Durante processos infecciosos, o sistema nervoso central faz a ativação do sistema nervoso simpático, para a realização de ajustes metabólicos e, então, superar o processo estressor. Entretanto, uma ativação excessiva ou prolongada desse sistema, acaba por provocar uma resposta desequilibrada. Uma das respostas negativas mais evidenciadas durante o

desbalanço das atividades autonômicas é uma variabilidade da termorregulação (DÜNSER e HASIBEDER, 2009; WEHRWEIN e ORER, 2016).

O processo de indução a sepse através do modelo de CLP provocou uma queda na temperatura nos animais do grupo CLP na 6^a e 12^a horas após a indução a sepse, de 38°C para 36°C, sugerindo um desequilíbrio no controle da temperatura durante o processo séptico. Quando falamos de sepse, um dos principais eventos associados aos processos inflamatórios é a alteração da temperatura corporal, seja ela para mais (hipertermia) ou para menos (hipotermia) (BONE *et al.*, 1992). O estudo de Drewry *et al.*, (2015) nos traz a informação de que cerca de 20% dos pacientes diagnosticados com sepse apresentam hipotermia ao invés de hipertermia (ROMANOVSKY e SZEKELY, 1998).

Seguindo nossa pesquisa sobre as alterações provocados pela indução da sepse, dois principais tecidos tiveram seu peso avaliado em nossos experimentos, coração e pulmões (Figura 16). Na hora inicial, não observamos diferença no peso seco e molhado dos pulmões entre os animais sépticos e controle. Contudo, observamos que nas 24 horas após a indução séptica, os animais apresentaram um peso seco menor para o coração, quando comparado com os animais controle. Com este achado podemos pensar em perda de tecido cardíaco no decorrer da sepse, o que corroboraria para o aparecimento da perda na funcionalidade cardíaca, entretanto, há necessidade de estudos histológicos complementares.

Analisando as alterações descritas acima com a curva de sobrevivência podemos concluir que os tempos de 6 a 48 horas são caracterizados como os mais críticos para os animais, já que apresentam maior números de sinais indicativos de sepse e de mortes. Após as 72 horas observamos animais recuperados, sem alterações sugestivas de sepse e que, ao longo do tempo, serão reconhecidos como sobreviventes. A partir desses dados escolhemos os tempos que foram utilizados para a realização desta pesquisa; a fase inicial (6 e 24 horas), a fase de recuperação (72 horas) e os sobreviventes (15 e 30 dias).

A variação no perfil hematológico é uma das alterações mais frequentes durante a sepse, caracteriza-se pelo aumento dos números de leucócitos no decorrer da doença (GUCYETMEZ & ATALAN, 2016). Nossos resultados mostraram que na fase de aparente recuperação dos animais induzidos ao choque séptico, 72 horas após a indução, os níveis mensurados de leucócitos no sangue estão semelhantes

aos do grupo controle. Entretanto, nos que sobreviveram à sepse, 30 dias após a indução, observamos que há uma trombocitose e leucocitose com aumento do número de monócitos, sugerindo o aparecimento de um novo processo inflamatório, semelhante àquele encontrado na fase aguda, conforme observamos na tabela 1.

Os monócitos são fundamentais na resposta imunológica à sepse. A partir deles, o agente causador da infecção é reconhecido e o processo inflamatório é desencadeado. Essas células são produzidas na medula óssea e são capazes de migrar rapidamente para os tecidos e diferenciar-se em macrófagos ou células dendríticas (LEBLOND *et al.*, 2015). Nos tecidos cardíacos após estimulados os macrófagos podem ser diferenciados em fenótipo M1 (associado à estimulação imunológica) e fenótipo M2 (ligado a angiogênese e reparo tecidual) (NAHRENDORF, PITTET, SWIRSKI, 2010).

O trabalho de Leblond (2015), por exemplo, refere que a depleção de macrófagos M2 está associada a significativa redução da função cardíaca em animais pós infarto agudo do miocárdio. Essa disfunção caracteriza-se pela diminuição da fração de ejeção, aumento da área de infarto, diminuição do depósito de colágeno e aumento da presença de células inflamatórias no tecido isquêmico.

Uma hipótese, ainda que especulativa, é de que a trombocitose encontrada nos animais sobreviventes à sepse pode estar relacionada a monocitose, uma vez que a ativação da cascata de coagulação e o aumento do volume de plaquetas estão relacionados com a expressão de fatores teciduais, a partir de leucócitos. As plaquetas são elementos integrantes da resposta imune e estão envolvidas, não só na hemostase, mas também na depuração de patógenos durante processo infeccioso e de reparo tecidual (DEWITTE *et al.*, 2017), para melhor compreendermos sua ativação, nos sobreviventes à sepse, há necessidade de uma investigação hematológica mais detalhada.

Durante o processo séptico, a ativação ou degradação plaquetária excessiva, está associada a um prognóstico desfavorável e um elevado risco de mortalidade (ZAMPIERI *et al.*, 2014). Alterações no perfil hematológico, como leucocitose e variações no quantitativo de plaquetas, durante o processo séptico, são bastante descritas na literatura. Entretanto, nosso trabalho traz como achado importante para a pesquisa nessa área, o reaparecimento de um perfil leucocitário semelhante ao encontrado na fase aguda da doença, somado à uma contagem plaquetária superior

ao dos animais controle. Sendo assim, observamos que mesmo trinta dias depois da indução de sepse, as lesões derivadas do insulto séptico parecem resultar um processo inflamatório que, por si, desencadeia ativação plaquetária e lesões, principalmente no sistema cardiovascular. Muitos estudos associam o aumento do volume plaquetário, a ativação plaquetária e a monocitose, a eventos adversos no sistema cardiovascular (CHU, 2010; ZAMPIERI *et al.*, 2014; TAJARERNMUANG *et al.*, 2016; IBA *et al.*, 2019), mesmo que o aumento do volume de plaquetas não signifique, necessariamente, maior agregação plaquetária.

Durante a sepse, essas graves respostas inflamatórias e suas consequentes disfunções orgânicas, provocam edema e prejuízo parenquimatoso em tecidos como o pulmão (ZENG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). Os animais recuperam-se 72 horas após a indução e não apresentam diferenças entre os pesos do coração e pulmões. Entretanto, nos sobreviventes à sepse 30 dias após a cirurgia de CLP, um edema foi encontrado nos pulmões, uma vez que seus pesos molhados foram significativamente maiores, quando comparados aos dos animais controle. O edema pulmonar encontrado pode ter relação direta com a disfunção cardíaca, já que é uma das principais consequências clínicas da insuficiência cardíaca.

Estudos apontam alterações importantes na estrutura histológica e no peso dos corações de animais durante atividade inflamatória exacerbada. Alguns trabalhos, como o de Vaez *et al.*, (2016), que utilizou o modelo de endotoxemia, mostram que a relação entre o peso seco/molhado do coração desses animais endotoxêmicos encontrou-se superior à dos animais controle, sugerindo um edema provocado pelo insulto inflamatório induzido pelo modelo. Em nossa pesquisa, ao pesarmos o coração molhado e seco dos animais sobreviventes à sepse, observamos que a relação peso molhado pelo peso do corpo desses animais não se difere do grupo controle (Figura 16). Entretanto, o peso seco desse tecido encontra-se significativamente inferior ao do grupo controle, nos 30 dias após a indução, sugerindo que parte do peso desses corações advinha de acúmulo de líquido – edema - e não da estrutura orgânica.

Os resultados apresentados até o momento nos levam a crer que o conjunto de alterações hematológicas somado às alterações encontradas no tecido dos órgãos pesados, representam o reaparecimento de um processo patológico característicos da sepse. Além disso, iremos discutir nos parágrafos seguintes outras alterações que

fortalecem a ideia de que os animais sobreviventes voltam a apresentar disfunções decorrentes do processo séptico.

Uma avaliação abrangente da hemodinâmica cardíaca se faz essencial para definir o significado fisiopatológico da sepse e determinar possíveis alvos terapêuticos, e isso pode ser obtido através de ferramentas de imagem (por exemplo ecocardiograma) e dados de pressão do ventrículo esquerdo. No entanto, uma investigação mais detalhada pode ser obtida pela análise da relação pressão-volume ventricular esquerda (CINGOLANI & KASS, 2011). No presente estudo, utilizamos um cateter de pressão-volume, inserido no ventrículo esquerdo do coração de ratos, previamente anestesiados, em uma abordagem com tórax fechado. Essa técnica nos permitiu a avaliação *in vivo* da funcionalidade do coração.

Com esta metodologia foi possível analisar diferentes parâmetros hemodinâmicos durante a sepse, e caracterizar a presença ou não de disfunções cardíacas dos tipos sistólica e diastólica. Segundo os estudos de Goddard *et al.*, (1996) e Brown & Jones (2004) a insuficiência contrátil do coração se dá após o reconhecimento do patógeno, onde os cardiomiócitos passam a expressar altos níveis de moléculas de adesão celular, secretam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que iniciam o processo inflamatório local, e expressam moléculas reguladoras de cálcio, que diminuem o cálcio intracelular, reduzindo sua eficiência contrátil e interferindo no acoplamento excitação-contração.

A disfunção miocárdica, induzida pela sepse, é uma complicação comum em humanos e em modelos experimentais e, além de estar relacionada com o comprometimento da contratilidade do ventrículo esquerdo, é, também, definida como uma disfunção sistólica e/ou diastólica miocárdica (KARROWNI & CHATTERJEE, 2014). A função sistólica cardíaca é determinada a partir dos volumes ejetados no ventrículo esquerdo e em sua capacidade de ejeção (BUCK *et al.*, 1997), enquanto a diastólica se refere à capacidade da câmara cardíaca, de receber volume de sangue adequado durante a diástole, em situações de pressão diastólica normal e volumes suficientes (KARROWNI & CHATTERJEE, 2014).

Essas disfunções cardíacas podem ocorrer em humanos (POELAERT *et al.*, 1997; EHRMAN *et al.*, 2018) e roedores que evoluem para choque séptico (LV & WANG 2016; KAKIHANA *et al.*, 2016), principalmente durante a fase inicial da doença, onde alguns estudos mostram prejuízos na contração coordenada do coração.

(GODDARD et al., 1996; PEAK et al., 2014). A fase sistólica do ciclo cardíaco é determinada pelos parâmetros de frequência cardíaca, trabalho sistólico e o débito cardíaco, que juntos influenciarão na fração de sangue ejetado pelo ventrículo. Neste presente estudo observamos que a capacidade de bombeamento de sangue desses animais sépticos está diminuída nas horas iniciais da sepse (6 e 24 h após o CLP), uma vez que a quantidade de sangue bombeada em determinada unidade de tempo, o débito cardíaco, encontra-se diminuída até 45% nos animais sépticos, quando comparado com o grupo controle (Figura 9).

Nas horas iniciais, os animais sépticos, também apresentam uma queda no volume sistólico de 54% na 6^a hora e 46% na 24^a hora (comparado com o grupo controle) o que, por si só, poderia provocar uma redução do débito cardíaco. A queda dos volumes sistólicos torna a disfunção cardíaca mais grave e somado ao prejuízo na contratilidade cardíaca, exercem uma influência negativa no parâmetro de trabalho sistólico, o qual também se encontra reduzido em 46% na 6^a hora e 41% na 24^a hora, ao compararmos com seus respectivos grupos controles (Figura 9). Os prejuízos encontrados na função sistólica resultaram em uma baixa fração de ejeção, que na 24^a hora chega a ser inferior a 25%. Juntos, esses dados fortalecem a ideia que há uma insuficiência sistólica capaz de impedir o bombeamento adequado de sangue para a grande circulação, causando baixo fluxo de oxigenação aos tecidos.

Apesar do aumento da frequência cardíaca durante a fase hiperdinâmica da sepse (KAKIHANA et al., 2016) influenciar positivamente o débito cardíaco, e assim compensar a perda de volume, nos tempos avaliados durante nossos experimentos não observamos esse tipo de compensação (Figura 9). Estas alterações enaltecem a nossa reflexão sobre o prejuízo no fluxo de sangue oxigenado que chega aos tecidos. Se pensarmos sobre as incapacidades motoras e prejuízos na respiração encontradas nesses animais, na aplicação do score para sepse, podemos associá-las, em parte, a essa baixa disponibilidade de oxigênio.

Convém lembrar que também fizemos a avaliação dos parâmetros diastólicos dos animais ao longo do tempo (Figura 11). Esses parâmetros avaliam a capacidade de relaxamento do coração na presença das disfunções provocadas pela sepse. Embora, os animais CLP 6 h, apresentem um tempo de relaxamento isovolumétrico inferior ao do grupo controle, eles possuem os parâmetros de volumes diastólicos reduzidos (Figura 11-A e C). Mesmo que apresentem uma melhor capacidade para se

relaxar, a baixa pressão sanguínea acaba por diminuir o volume de sangue que entra no coração para ser ejetado (Figura 8). Para os períodos iniciais da sepse nosso trabalho ficou limitado a descrever se há ou não uma insuficiência do tipo diastólica, já que há a necessidade de ferramentas adicionais capazes de avaliar outros parâmetros de volume como, por exemplo, a pressão venosa central.

As alterações cardíacas reconhecidas até o presente momento são uma das características conhecidas como fator de risco para um mal prognóstico em pacientes sépticos. A divulgação científica das alterações desses parâmetros se faz essencial para o tratamento precoce da disfunção cardiovascular observada na sepse, já que se baseia, principalmente, na manutenção do débito cardíaco, através da utilização de agentes inotrópicos positivos (KUMAR *et al.*, 2000). A revisão de Dubin, Lattanzio e Gatti (2017) afirma que o tratamento dessa insuficiência cardiocirculatória, durante a sepse, baseia-se na utilização de agentes como a dobutamina, uma catecolamina agonista dos receptores beta-1-adrenérgicos do coração, capaz de aumentar o cálcio intracelular, a força de contração da musculatura cardíaca e, então, o débito cardíaco. Embora seja a primeira linha de escolha recomendada pela *Surviving Sepsis Campaign*, ainda há uma análise se seus efeitos positivos se sobressaem aos negativos (RHODES *et al.*, 2017).

A partir dos nossos conhecimentos sobre a indicação do uso da dobutamina para a manutenção do débito cardíaco adequado, utilizamos este agente beta adrenérgico nos animais sépticos e avaliamos seus efeitos sobre os parâmetros cardíacos. Nas horas iniciais do processo séptico (6 e 24h), quando comparados com o grupo controle, esse agente apresentou um efeito maior no aumento da fração de ejeção e, assim, no volume de sangue ejetado (volume sistólico) a cada batimento (Tabela 3). Esses dados sugerem que durante a utilização deste agente, nas horas iniciais do processo séptico, há uma melhora do volume ejetado. A utilização da dobutamina, também, poderia melhorar o desempenho cardíaco através do aumento do cronotropismo, entretanto, não observamos respostas diferentes na frequência cardíaca desses animais, na 6^a e 24^a hora, comparado com seu respectivo grupo controle (tabela 3).

Além da utilização dos agentes agonistas beta adrenérgicos para otimizar a função cardíaca, os agonistas alfa adrenérgicos são utilizados para alcançar melhora hemodinâmica (YIN *et al.*, 2017), sendo assim, fizemos a utilização do agente

vasopressor fenilefrina para avaliar a resposta cardíaca diante das alterações pressóricas. Nas 6 primeiras horas após a cirurgia de CLP, os efeitos pressóricos da fenilefrina fazem com que o coração tenha um maior trabalho sistólico e débito cardíaco, comparado com seus efeitos sobre o grupo controle. Possivelmente, provocado pelo aumento da pré-carga cardíaca, já que com a utilização deste agente, os animais sépticos apresentam maior efeito sobre o volume sistólico e menor efeito na pressão diastólica final (Tabela 4). Ao agir sobre os receptores alfa adrenérgicos nos vasos, a fenilefrina é capaz de provocar a contratilidade do músculo liso vascular e assim, aumentar a pressão sanguínea, permitindo que o sangue atinja as câmaras cardíacas com maior rapidez. Esse conjunto de alterações pode estar atuando como um mecanismo volume compensatório para a manutenção do débito cardíaco, mesmo sem um aumento da frequência cardíaca.

Até este ponto, podemos destacar que os animais na fase aguda do processo séptico (6 e 24 horas após a CLP) apresentaram insuficiência cardíaca de características sistólicas e talvez diastólicas. Observamos também que, nas fases iniciais, a resposta inotrópica positiva da dobutamina, assim como os efeitos pressóricos da fenilefrina, parecem otimizar o prejuízo no débito cardíaco durante o processo séptico. Seguindo a linha temporal de indução a sepse, é notória a recuperação do grupo CLP na 72^a hora. Esse tempo pós sepse é caracterizado, não apenas pela recuperação dos animais observar a partir do score para sepse (Figura 8), mas também a recuperação cardíaca (Figuras 9, 10 e 11). A maioria dos parâmetros cardíacos basais dos animais CLP 72 h, quando comparados com o grupo controle, não apresentaram diferenças significativas, conseguiram manter volumes sistólicos necessários para a manutenção do débito cardíaco.

Ao analisarmos os efeitos das drogas vasoativas nos animais sépticos na 72^a h, assim como encontramos a maioria dos valores basais indiferentes, quando comparados com o grupo controle, a resposta do coração a dobutamina também não se diferiu. No entanto, durante a utilização do agente vasopressor fenilefrina observamos ausência de resposta para o parâmetro de volume sistólico. Vale destacar que esses animais apresentaram uma redução da resposta pressórica a fenilefrina (Figura 08), o que provoca um prejuízo nos volumes cardíacos (sistólicos e diastólico), justificando, então, essa redução.

Após o processo de disfunção sistólica, na fase inicial, a aparente recuperação cardíaca encontrada no tempo de 72 h após a CLP, manteve-se nos animais sobreviventes no tempo de 15 dias após a indução à sepse. Nesse período, não encontramos nenhuma alteração nos valores basais dos parâmetros cardíacos avaliados (comparados com o grupo controle), o que fortalece nossa ideia de que esses animais passaram pelo processo séptico, sobreviveram ao mesmo e recuperaram sua função cardíaca. No entanto, no tempo de 30 dias após a CLP, os sobreviventes da sepse voltam a apresentar um perfil de disfunção cardíaca semelhante aos encontrados nos animais sépticos na 6^a e 24^a hora. O prejuízo sistólico foi caracterizado pela redução dos parâmetros de trabalho sistólico, volume sistólico, fração de ejeção e débito cardíaco, quando comparados com o grupo controle (Figuras 9 e 10).

Sabe-se que a baixa função sistólica do ventrículo esquerdo está relacionada a um pior prognóstico em inúmeras doenças cardíacas, independente de outras morbidades, já que reduz a capacidade de retorno à circulação com volumes adequados. Por si só, na insuficiência cardíaca do tipo sistólica com fração de ejeção diminuída, a taxa de sobrevida em 5 anos, para todos os pacientes, é menor que 50% (PEANA & DOMEIER, 2017).

O cenário de insuficiência cardíaca, com fração de ejeção diminuída, que encontramos na fase inicial do choque séptico e que ressurgem após 30 dias, reduz ainda mais a possibilidade desses animais seguirem sobrevivendo e nos alertam para a necessidade de ferramentas que antecipem seu diagnóstico, além de um olhar atento dos pesquisadores, na tentativa de reverter este quadro, e, com isso, amenizar suas consequências em órgãos alvos como rins e cérebro, reduzindo a mortalidade dos pacientes sobreviventes à sepse.

A partir deste ponto, vamos analisar os significados das alterações dos parâmetros avaliados, para os sobreviventes à sepse. Sabe-se que o trabalho sistólico é a base para o cálculo do funcionamento mecânico do coração e o consumo de oxigênio pelo miocárdio. Ele é dado através da avaliação dos volumes e pressões sistólicas e diastólicas do ventrículo, durante o ciclo cardíaco (BOLT et al., 2009; SONG et al., 2009; SCHILLER, VIKHOLM e HELLGREN, 2015). A diminuição deste índice, conforme encontrado nos animais do grupo CLP 30 dias, indica

comprometimento da função sistólica e conseqüentemente um menor volume de ejeção.

Podemos associar o prejuízo no trabalho sistólico com a diminuição do volume sistólico, encontrada nos sobreviventes à sepse. Nesses animais o baixo volume de sangue ejetado compromete o débito cardíaco e a fração de ejeção, conforme os resultados encontrados nas Figuras 9 e 10, reduzindo a pós-carga. Através do controle adaptativo ao mecanismo de Frank-Starling, o baixo débito cardíaco deveria ser compensado pelo aumento da frequência de contrações (KOPEL *et al.*, 2001; SHIELS & WHITE 2008; SELA & LANDSBERG, 2009; OH & CHO, 2020). Porém, em nossos estudos, a frequência cardíaca seguiu inalterada, caracterizando uma bradicardia relativa, ou seja, funcionamento da bomba cardíaca inadequado para a situação apresentada.

Na Figura 13 observamos os registros típicos da curva P-V de animais sobreviventes à sepse comparado com os de animais controle, capturados a partir de experimentos realizados nesse trabalho. Quando comparado com o grupo controle, observamos uma redução da curva volume ventricular nos sobreviventes à sepse, justificando o prejuízo no trabalho sistólico e fração de ejeção, e fortalecendo nossa ideia de que há uma insuficiência cardíaca do tipo sistólica. Em animais sobreviventes à sepse, nosso estudo, é o primeiro a descrever esse perfil de disfunção.

Sabemos que grandes artérias tem uma importância na absorção do impacto das oscilações de pressões impostas pelo coração. Suas propriedades elásticas determinam o componente pulsátil durante a pós-carga, influenciando diretamente o trabalho exercido pelo ventrículo esquerdo. Sendo assim, também avaliamos a elastância arterial dos animais sobreviventes à sepse, calculada a partir da razão da variação da pressão sistólica final pelo volume sistólico, a qual mostrou-se alterada nos animais sobreviventes à sepse após 30 dias, onde encontrou-se aumentada (Figura 14), quando comparados a seus respectivos controles.

A elevação da elastância arterial nos sobreviventes é derivada de um aumento na pressão intraventricular e colabora para a redução do volume máximo presente na câmara cardíaca conforme observamos nos resultados expostos na Figura 12, mas não é acompanhada de variações na frequência cardíaca. Apesar da ausência de diferenças significativas na pressão arterial média desses animais (Apêndice B) o aumento da elastância arterial e da pressão sistólica final sugerem que o coração de

animais sobreviventes à sepse (grupo 30 dias) desenvolve, continuamente, maior força na fase de ejeção, para cada ciclo cardíaco, o que a longo prazo gera efeitos deletérios para o músculo cardíaco.

Além do processo disfuncional encontrado durante a fase sistólica, também observamos disfunção cardíaca do tipo diastólica, determinada a partir dos resultados que apresentaram uma perda na complacência do ventrículo esquerdo, avaliados pelos parâmetros de pressão diastólica final e sua capacidade de relaxamento (TAU), apresentados na Figura 11. Os parâmetros avaliados a partir do TAU, refletem o tempo de relaxamento ventricular esquerdo durante a diástole e, quanto mais alto esse valor, maior o tempo necessário para relaxar e ocorrer o preenchimento da câmara cardíaca por sangue (LANSPA *et al.*, 2019; HOFFMAN *et al.*, 2019). O aumento do TAU, associado ao aumento da pressão diastólica final nos animais sobreviventes à sepse sugere que, além da perda da função contrátil, os animais sépticos possuem uma deficiência de relaxamento, o que, somada à disfunção sistólica, intensifica a incapacidade de manter uma baixa pressão diastólica de enchimento e o débito cardíaco adequado.

A disfunção diastólica ventricular esquerda é comum em paciente com sepse e, geralmente, está associada à administração de fluidos na ressuscitação e, também, com as pressões elevadas durante o enchimento ventricular esquerdo (KAKIHANA *et al.*, 2016; EHRMAN *et al.*, 2018). A Sociedade Americana de Ecocardiografia (ASA) define a disfunção do tipo diastólica a partir de parâmetros que envolvem alterações na velocidade diastólica (LANSPA *et al.*, 2016; LANSPA *et al.*, 2019). A alta pressão diastólica e TAU refletem uma incapacidade de relaxamento ventricular esquerdo (Figura 11) e vão ao encontro dos conceitos abordados pela ASA, acerca das alterações de velocidade de relaxamento apresentadas durante a sepse. Este trabalho apresenta pela primeira vez que, mesmo sobrevivendo à sepse, os animais apresentam uma insuficiência cardíaca do tipo diastólica.

Apesar de não observamos disfunções cardíacas que indiquem prejuízo diastólico na fase de recuperação, 72 h após a CLP, encontramos uma compensação bem-sucedida do débito cardíaco e um maior trabalho sistólico (Figura 09) quando comparado com o grupo CLP nas horas iniciais (6 e 24 horas). Em longo prazo, as atividades compensatórias podem acabar provocando alterações estruturais na

câmara ventricular esquerda, gerando os distúrbios diastólicos visto nos sobreviventes (30 d após a CLP).

Além dos experimentos que indicaram a disfunção diastólica *in vivo*, também realizamos experimentos *in vitro*, com o coração de animais sobreviventes à sepse. Nesse modelo, livre de influências do sistema nervoso autônomo, conseguimos observar que os corações dos sobreviventes, quando comparados aos controles, geraram uma menor força de tensão a cada batimento e, com isso, um aumento no tempo para completar um ciclo cardíaco, originado pelo aumento do tempo para a fase de relaxamento (Figura 13). Esse prejuízo vai ao encontro dos dados *in vivo*, sobre a existência de uma disfunção, também diastólica.

Os danos cardíacos, nos animais sobreviventes à sepse, são uma consequência da doença, neste trabalho, caracterizada através do modelo *in vivo* e *in vitro* a partir do prejuízo na contratilidade cardíaca, redução da fração de ejeção e prejuízo no relaxamento. Os mecanismos subjacentes à insuficiência cardíaca, decorrentes da sepse, ainda são pouco conhecidos e merecem destaque já que as disfunções cardíacas do tipo sistólica e diastólica, presentes nos sobreviventes à sepse, são capazes de aumentar a mortalidade.

Nosso objetivo inicial foi desenvolver um trabalho capaz de descrever as alterações cardíacas causadas pela sepse e então, investigar as vias que pudessem justificar os prejuízos encontrados. Esperamos seguir essa linha de pesquisa dentro do nosso laboratório para investigar as causas das insuficiências cardíacas encontradas nos sobreviventes. Entre as vias a serem avaliadas, destacamos as vias de sinalização de cálcio e a participação das espécies reativas de oxigênio. Segundo Liu *et al.*, (2017), os canais de cálcio tipo L estão diminuídos durante a sepse, justificando sua resposta reduzida ao receptor de rianodina ao cálcio e a via RhoA/ROCK, a qual parece estar envolvida no processo fisiopatológico da hipertrofia cardíaca e remodelamento ventricular (PETERS & MICHEL, 2007; PREAU *et al.*, 2016).

Inúmeros trabalhos mostram que o desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio durante a sepse provoca lesões cardíacas e, com isso, prejuízos na sua função (BELLINGER, 2005; ZANOTTI-CAVAZONNI & HOLLENBERG, 2009; VICTOR *et al.*, 2009; LIU, YU, SHOU, CHAI, 2017), entretanto, não avaliam as consequência para os que sobrevivem a sepse. Realizamos uma análise inicial do equilíbrio entre

os agentes antioxidantes e oxidantes no período de 72 horas e 30 dias após o CLP, fazendo com que este trabalho seja o primeiro a rastrear a participação desse sistema nas disfunções cardíacas observadas nos animais sobreviventes à sepse.

O sistema que envolve agentes oxidativos e anti-oxidativos é caracterizado por reações que envolvem transferências de elétrons de uma molécula para outra. Quando os níveis de espécies reativas de oxigênio excedem a capacidade antioxidante das células, a homeostasia do sistema é alterada e surge o aparecimento de agentes oxidativos (p.ex. superóxido e peróxido de hidrogênio). Quando isso ocorre, a fim de evitar potenciais danos celulares, os agentes antioxidantes são liberados pelas células (LI *et al.*, 2010).

No coração dos animais recuperados e sobreviventes observamos a diminuição de SOD e glutathione-S-transferase (GST) em ambos os grupos, o que sugere uma diminuição das suas participações no controle oxidativo, proporcionando um ambiente capaz de provocar danos celulares. A diminuição de SOD e GST em animais sobreviventes, pode ter como reflexo o aumento dos agentes oxidativos, decorrentes do processo inflamatório, como por exemplo o radical hidroxila, um dos agentes oxidantes mais reativos, capaz de provocar danos estruturais nas proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (BRIEGER *et al.*, 2012).

Além dos agentes antioxidantes reduzidos, esses animais que sobreviveram ao processo séptico apresentaram outras alterações. Houve um aumento da presença de mieloperoxidase (MPO), enzima que, ao reagir com superóxido, é capaz de aumentar a produção de ácido hipocloroso, que apesar de ter uma importante participação na eliminação de patógenos, também tem capacidade de se fixar no DNA e assim provocar danos celulares (BALLINGER, 2005; BRIEGER *et al.*, 2012).

A enzima mieloperoxidase é encontrada predominantemente nos leucócitos e, como demonstrado anteriormente, os animais sobreviventes à sepse, além da insuficiência cardíaca, apresentaram o surgimento de uma leucocitose, o que justificaria, em partes, o aumento da MPO. Segundo o trabalho de Roman, Wendland e Polanczyk (2007), durante as doenças coronarianas, há uma migração leucocitária para a zona de lesão e, assim, um aumento local das atividades de MPO, o que parece corroborar com a disfunção cardíaca. Para projetos futuros, temos o objetivo de investigar a participação leucocitária e antioxidativa no aparecimento das lesões cardíacas em animais sobreviventes à sepse.

Também encontramos um aumento de N-Acetil-glucosamina (NAG) no tecido cardíaco. Dentro das vias metabólicas encontradas durante a ativação imunitária, o NAG parece ser responsável pela inibição da enzima glicolítica hexoquinase, responsável pela formação do ATP, levando ao prejuízo na produção energética de macrófagos, provocando a liberação de espécies reativas de oxigênio, (O'SULLIVAN, KELLY, PEARCE, 2016), e assim um desequilíbrio através do aumento de agentes oxidativos.

O GSH é um agente antioxidante considerado um importante composto sulfidrila intracelular envolvido principalmente em reações de detoxificação. Contudo, sob estresse oxidativo, é convertido para glutathiona oxidada o que leva ao desvio da glicose para o ciclo da pentose para fornecer NADPH (JUNIOR, CHIARELLO, BERNARDES, VANNUCCHI, 1998). Os níveis aumentados para GSH e diminuídos para GST, nos animais sobreviventes à sepse, indicam um prejuízo associado a manutenção da homeostasia entre às espécies reativas de oxigênio. Dados semelhantes foram encontrados no trabalho de SOUZA *et al.*, (2018), em vasos, onde o desequilíbrio entre às espécies reativas de oxigênio, incluindo o aumento de GSH e diminuição de SOD, parecem amplificar o processo inflamatório nos vasos de animais sobreviventes à sepse, contribuindo para o comprometimento do sistema vascular (SOUZA *et al.*, 2016). Apesar de não explorarmos as atividades enzimática associada às EROs, observamos que o desequilíbrio entre GSH, SOD e GST, encontrados nos animais sobreviventes, podem contribuir para o reaparecimento de um processo de lesão tecidual cardíaca, e assim, o surgimento da insuficiência cardíaca.

Por fim, temos as lipooxigenases, que, assim como as mitocôndrias, participam do processo bioquímico de peroxidação dos ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxido lipídico (LOOH), podendo ser utilizada como um indicador de produção de EROs (BALLINGER, 2005). Ao pesquisarmos esse indicador, observamos que ambos os grupos expostos à sepse, possuem valores basais semelhantes aos dos grupos falso operados, sugerindo que esse agente não teria grande participação na insuficiência cardíaca. No decorrer do processo séptico, apesar da aparente recuperação (72 h após a CLP), o desequilíbrio entre agentes oxidativos e antioxidativos parece contribuir para a insuficiência cardíaca decorrente do processo séptico encontrado nos animais sobreviventes à sepse, 30 dias após a indução pela CLP.

É certo que as alterações derivadas da sepse se perpetuaram no decorrer do processo de recuperação. Essas modificações foram capazes não só de provocar lesões cardíacas, mas também, alterações na resposta do coração a agentes inotrópicos e na presença de agentes vasopressores. Os animais sobreviventes à sepse, 30 dias após a CLP, também apresentaram um perfil hiporresponsivo a agentes inotrópicos e vasopressores, confirmando a nossa ideia de que a função cardíaca retorna ao seu estado deprimido.

Os receptores alfa adrenérgicos são expressos no miocárdio incluindo alfa-1A e alfa-1B e, quando em condições fisiológicas, estão em menor quantidade no coração do que os receptores beta-adrenérgicos. São responsáveis por modularem inúmeras funções cardíacas, incluindo excitabilidade, contratilidade e metabolismo (JENSEN, O'CONNELL e SIMPSON, 2014). Durante a fase hiperdinâmica da sepse observa-se uma externalização dos receptores alfa adrenérgicos, o que justificaria o aumento da frequência cardíaca, entretanto, na fase hipodinâmica observa-se uma maior internalização. Nossos dados apresentaram uma resposta diminuída do coração a este agente nos animais CLP 30 dias após a cirurgia, sugerindo que as características depressoras da fase tardia da sepse persistem ou reaparecem nos sobreviventes.

A dobutamina, utilizada para a melhora da função cardíaca e, assim, à recuperação hemodinâmica, se demonstrou menos efetiva nos animais sobreviventes à sepse, uma vez que, 30 dias após a CLP os animais apresentaram uma menor resposta, comparados com o grupo controle. Este agente inotrópico positivo pareceu não ser capaz de aumentar os parâmetros de fração de ejeção e trabalho sistólico, o tanto quanto o fez nos animais controle e nos animais sépticos na fase inicial da doença. Na Figura 13 D podemos observar que, no registro típico, a curva PV ventricular em resposta à dobutamina (linhas cinzas), os eixos das ordenadas referentes a pressão intracavitária e o eixo das abscissas referentes aos volumes intraventriculares, encontram-se pouco diferentes da sua linha basal (linhas pretas) enquanto, nos animais controles observamos um aumento em ambos os eixos.

A indiferença visual entre as curvas/eixos nos animais sobreviventes, demonstram a baixa capacidade de aumentar o débito cardíaco, fração de ejeção e volume sistólico a partir do uso da dobutamina. Isso porque era esperado que a curva de pressão intraventricular aumentasse com a utilização deste agente, uma vez que, ao provocar o aumento da disponibilidade de cálcio intracelular aumenta a força de

contração, resultando no aumento da pressão exercida no interior do ventrículo. Essa hiporreatividade à dobutamina resulta na incapacidade em aumentar a fração de sangue ejeção a cada minuto, e também o débito cardíaco.

No modelo *in vitro*, observamos um perfil semelhante em resposta a dobutamina. Os corações dos sobreviventes apresentaram uma resposta menor para a dose de 10 nmol no parâmetro que avalia a força desenvolvida pelo coração perfundido, durante a utilização da droga (Figura 13-B). Através da figura que representa a tensão gerada pelo coração e as respostas a dobutamina, encontramos além da tensão basal menor, o pico da curva resposta reduzido, quando comparado com o grupo controle. A resposta apresentada, através do estudo do coração por este modelo sugere que a hiporresponsividade é independente da ação autônoma e livre das condições de pré e pós-carga, ou seja, está relacionada à capacidade mecânica do coração.

A hiporresponsividade cardíaca se torna um problema para os pacientes que desenvolveram a sepse, já que os tratamentos para a insuficiência cardíaca estão ligados aos agentes inotrópicos, que ajudam a manter a estabilidade hemodinâmica e mantêm o estado do fluido e das pressões pulmonares otimizadas (TARIQ & ARONOW, 2015), no entanto, nossos resultados mostraram que, em animais sobreviventes à sepse, a dobutamina parece exercer menor efeito sobre o volume sistólico e a capacidade ejetora do coração. Uma das possíveis causas para a redução nos efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos da dobutamina, encontrados nos animais sobreviventes à sepse, pode estar ligada a perda dos receptores beta-adrenérgicos nos tecidos cardíacos durante a sepse. O trabalho de DAL SECO et al., (2017) analisou a saturação da ligação específica deste receptor durante a sepse, observando uma diminuição significativa no grupo CLP durante o quadro séptico, quando comparados com o falso operado, justificando a hiporresponsividade cardíaca às drogas cardiotônicas.

Nossa pesquisa apresenta pela primeira vez, a descrição das sequelas da sepse para o sistema cardíaco. O estudo de Hoffman *et al.*, (2019) refere que a incapacidade do coração em manter sua função de relaxamento, fração de ejeção e débito cardíaco, parece estar relacionada a um remodelamento anatômico ocasionado durante a sepse. Entretanto, não encontramos estudos que descrevem esse

remodelamento no pós sepse, sendo esta teoria uma outra via a ser estudada em um futuro trabalho.

É importante ressaltar que os danos secundários ao miocárdio, devido ao quadro de sepse, caracterizam uma das principais causas de óbito e, também, uma maior incidência de morbidades cardiovasculares. Em nosso estudo, os animais sobreviventes à sepse claramente desenvolveram uma insuficiência cardíaca relacionada ao processo séptico ao qual foram expostos, caracterizada por um prejuízo na capacidade do ventrículo de ejetar e encher-se de sangue.

Em pacientes humanos, essas alterações levam a morbidades e mortalidades significativas, comprometendo sua qualidade de vida (ZHANG *et al.*, 2013). O estudo de Quartin *et al.* (1997) avaliou pacientes sobreviventes à sepse durante e até oito anos após a internação hospitalar ou óbito. Desses, 45% apresentaram quadro compatível com sepse grave e 15% a choque séptico. De todos os pacientes avaliados, o estudo mostra que apenas 30% sobreviveram ao final de dois anos. Além disso, segundo Vallabhajosyula *et al.*, (2018), aqueles que desenvolveram disfunção do ventrículo esquerdo durante a sepse, apresentaram uma incidência maior nas internações hospitalares, por insuficiência cardíaca descompensada aguda, além de elevada taxa de mortalidade ao longo dos dois anos seguintes.

Eventos como infarto agudo do miocárdio, ataque transitório e revascularização da artéria coronariana são comuns nos sobreviventes à sepse tornando as doenças cardiovasculares uma causa importante para o aumento da mortalidade desses pacientes a longo prazo. Segundo o trabalho de Yende *et al.*, (2014) os sobreviventes à sepse tem um risco 13 vezes maior em desenvolver problemas cardiovasculares, se comparados com indivíduos que nunca tiveram sepse.

Outro estudo descreve que em 5 anos, 61% dos pacientes humanos que sobreviveram a sepse evoluíram para óbito; nos demais sobreviventes, foi encontrada uma qualidade de vida ruim, causando um aumento no número de internações hospitalares ao longo dos anos (CUTHBERTSON *et al.*, 2013). As disfunções herdadas da sepse trazem uma taxa de mortalidade após a alta da UTI de até 63% nos primeiros seis meses e até 38% no primeiro ano (GONÇALVES *et al.*, 2019). A caracterização dos eventos cardíacos causados pela sepse, discutidos a partir deste trabalho, poderá colaborar para pesquisas posteriores, com foco na prevenção e

melhora da função cardíaca, e, assim, proporcionar uma melhor qualidade de vida aos sobreviventes, e, com isso, uma diminuição das taxas de internações hospitalares e uma conseqüente redução de gastos públicos.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados discutidos nesta pesquisa, concluímos que durante o processo séptico, há uma disfunção cardíaca observada na fase inicial e representada pela sua incapacidade contrátil, com aparente recuperação 72 horas e 15 dias após a indução pelo modelo de CLP. Essas disfunções cardíacas estão acompanhadas de alterações indicativas de sepse, como alteração de temperatura retal, alterações motoras, respiratórias e pressóricas. Além dessas alterações, esses animais apresentaram sinais de choque séptico, representado pela sua hiporresponsividade para drogas vasoativas.

Apresentamos resultados inéditos acerca dos efeitos da sepse a longo prazo, ou seja, nos sobreviventes 30 dias após a indução, onde observamos que os dados que representaram disfunções cardíacas reaparecem. Os dados adquiridos através do modelo *in vitro* suportam os obtidos *in vivo*, mas também acrescentam a ideia de que os efeitos da sepse causam prejuízo na capacidade mecânica do coração, claro, influenciada pelas alterações vasculares, orgânicas e de volume.

Por fim, novos estudos precisam ser realizados a fim de desvendar as possíveis causas dessas alterações e, assim, propor diferentes abordagens terapêuticas que possam amenizar as sequelas causadas pela sepse no sistema cardíaco dos que sobrevivem a ela. A Figura 17 ilustra nossos achados inéditos acerca dos sobreviventes à sepse e apresenta algumas linhas de pesquisas propostas para a continuidade deste trabalho.

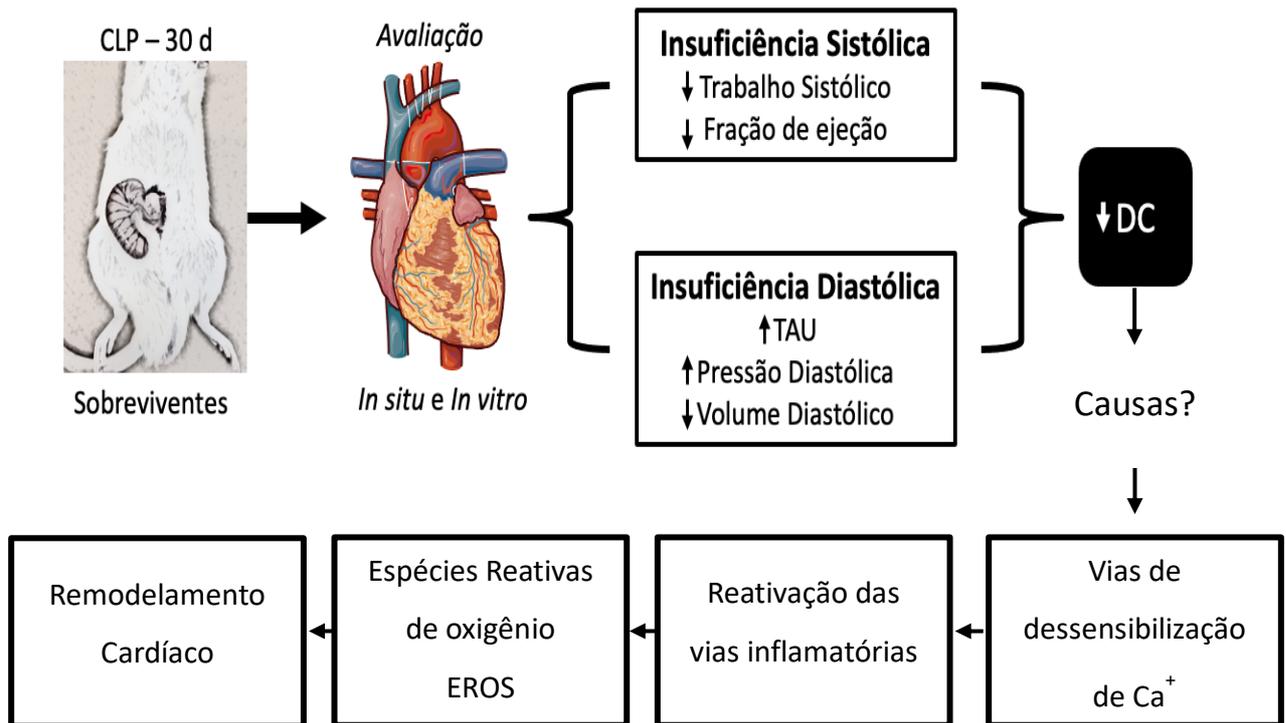


Figura 17: Alterações cardíacas encontradas nos sobreviventes à sepse. No trigésimo dia após a indução a sepse pelo modelo de CLP, os animais foram considerados sobreviventes às alterações orgânicas, vasculares e cardíacas. Entretanto, através da avaliação cardíaca *in vivo* e *in vitro*, observamos que as disfunções cardíacas encontradas nas fases iniciais reaparecem, caracterizadas como uma insuficiência cardíaca do tipo sistólica e diastólica. A diminuição da capacidade ejetora e de relaxamento reduz o débito cardíaco, provocando um prejuízo na perfusão sistêmica. Como objetivos futuros dos resultados desta tese fica a investigação sobre as causas e mecanismos que originam essas insuficiências, dentre eles: Dessensibilização das vias de cálcio, reativação das vias inflamatórias, participação das espécies reativas de oxigênio e o remodelamento cardíaco. Fonte: próprio autor e acervo digital *Smart Servier Medical Art*.

7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, E.S; CASTILLO, J.M; SILVEIRA, C.A.M; SEPULVEDA, D.L. et al. Ecocardiograma transesofágico tridimensional em tempo real: avaliação de próteses valvares. **Rev. Bras. Ecocardiogr. Imagem Cardiovasc.**26(3).206-211.2013;

ALBUQUERQUE, N.L.S; OLIVEIRA, A.S.S; SILVA, J.M; PERES, A.A. et al. Relationship between cardiac ajection fraction and blood pressure in coronary heart patientes. **Rev. RENE.** 18(5).584-590.2017;

AMMANN, P; FEHR, T; MINDER, E. *et al.* Elevation of troponin I in sepsis and septic shock. **Intensive Care Med.** 27, 965–969.2001;

ARAUJO, C.V; ESTADO, V; TIBIRIÇA, E; BOZZA, P.T; CASTRO-FARIA-NETO, H.C; SILVA, A.R. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. **Microvasc. Res.** 84(2). 218-221. 2012;

ARNOLD, M; KATZ, M.D. The descending lim of the Starling Curve and the failing heart. **Circ. Res. Suppl.** 32(6). 871-75. 1965;

ASSREUY, J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocr. Metab. Immune. Drug Targets.** 6(2). 165-73. 2006;

ALMEIDA, L.M.C; DINIZ, M.S; DINIZ, L.D; MACHADO-PINTO, J; SILVA, F.C.L. Comparative study of the prevalence of sepsis in patients admitted to dermatology and internal medicine wards. **An. Bras. Dermatol.** V88. N5. Rio de Janeiro. Set/Out. 2013;

ANNANE, D.; VIGNON, P.; RENAULT, A.; BOLLAERT, P.E.; CHARPENTIER, C.; MARTIN, C.; TROCHÉ, G.; RICARD, J.D.; NITENBERG, G.; PAPAZIAN, L.; AZOULAY, E.; BELLISSANT, E. Norepinephrine plus dobutamine versus epinephrine alone for management of septic shock: a randomised trial. **J. Lancet.** V370. N9588. 676-684. 2007;

BALLINGER, S.W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. **Free Radic. Biol. Med.** 38(10):1278-1295. 2005;

BELCHER, E; MITCHELL, J; EVANS, T. Myocardial dysfunction in sepsis: no role for NO? **Heart.** 87:507-509. 2002;

BERNARD, C. **Leçons sur les effets de la chaleur e sur la fièvre.** Paris: Bailliere. 471p. 1876;

BOFFA, J.J; ARENDSHORST, W.J. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during edotoxemic shock. **J. Am. Soc. Nephrol.** 16(1).117-24. 2005;

BONE, R.C. The pathogenesis of sepsis. **Ann. Intern. Med.** V115: 457-469. 1991;

BONE, R.C; BALK, R.A; CERRA, F.B;DELLINGER, R.P; FEIN, A.M;KNAUS, W.A; SCHEIN, R.M.H; SIBBALD, W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**. 101(6): 1481-1483. 1992;

BOUDOULAS, K.D; BORERJ.S; BOUDOULAS, H. Heart rate, life expectanxy and the cardiovascular system: therapeutic considerations. **Cardiology**. 132.199-212.2015;

BOLT, C.L; BAUR, L; STOFFERS, J; LENDERINK, T. et al. Novel Strategies for the detection of systolic and diastolic heart failure. **Curr. Cardiol. Rev**. 5.112-118.2009;

BOMBARDINI, T; MORRONE, D; HUQI, A; CIAMPI, Q; COSTANTINO, M; PICANO, E. The relative prognostic value of different indices of global left ventricular function during stress echocardiography: the bright side of the force. **Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging**. 20. 2019.

BÖHM, M; REIL, J.C; DEEDWANIA, P; KIM, J.B. et al. Resting heart rate: risk indicator and emerging risk factor in cardiovascular disease. **Am. J. Med**. 128.219-228.2015;

BRADLEY, P.P; CHRISTENSEN, R.D; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. 60(3). 618-622. 1982;

BRIEGER, K; SCHIAVONE, S; MILLER, F.J; KRAUSE, K. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Med. Wkly**. 142:W13659. 2012;

BROWN, M.A; JONES, W.K. NF- κ B action in sepsis: the innate immune system and the heart. **Front. Biosci**. 9. 1201-1217. 2004;

BUCK, T; HUNOLD, P; WENTZ, K.U; TKALEC, W; NESSES, H.J; ERBEL, R. Tomographic three-dimensional echocardiographic determination of chamber size and systolic function in patients with left ventricular aneurysm. **Circulation**. 96(12):4286-4297. 1997;

CAETANO, J; ALVES, J.D. Heart rate and cardiovascular protection. **Eur. J. Intern. Med**. 26(4).217-222.2015;

CINGOLANI, O.H; KASS, D.A. Pressure-volume relation analysis of moude ventricular function. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**.301.2198-2206.2011;

CHENGODE, S. Left ventricular global systolic function assessment by echocardiography. **Ann. Cardiac. Anaesthesia**.19.26-34.2016;

CHU, A.J; Blood coagulation as an intrinsic pathway for proinflammation: a mini review. **Inflamm. Allergy Drug Targets**. 9(1): 32-44. 2010;

CIKES, M.; SOLOMON, S.D. Beyond ejection fraction: an integrative approach for assessment of cardiac structure and function in heart failure. **Eur. Heart J.** 37(21). 1642-1650. 2015;

CLOWES, G.H; VUCINIC, J.M; WEIDNER, M.G. Circulatory and metabolic alterations associated with survival or death in peritonitis: clinical analysis of 25 cases. **Ann. Surg.** 163(6). 866-85. 1966;

CORREIA-PINTO, J; HENRIQUES-COELHO, T; OLIVEIRA, S.M; MOREIRA, A.F.L. Avaliação da função biventricular no rato: um novo modelo experimental. **Rev. Port. Cardiol.** 21(11).1295-1302.2002;

COEHN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature.** 420:885-891. 2002;

CRUZ, M.C; REIS, L. β -blockers in septic shock: are we there yet? **Rev. Bras. Ter. Intensiva.** 28(1). 1-3. 2017;

CUTHBERTSON, B.H; ELDERS, A; HALL, S; TAYLOR, J; MACLENNAN, G. et al., Mortality and quality of life in the five years after severe sepsis. **Crit. Care.** 17:R70. 2013;

DA SILVA-SANTOS, J.E; TERLUK, M.R; ASSREUY, J. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. **Shock.** 17(1). 70-76. 2002;

DA SILVA-SANTOS, J.E; CHIAO, C; LEITE, R; WEBB, R.C. The Rho-A/Rho-kinase pathway is up-regulated but remains inhibited by cGMP-dependent mechanisms during endotoxemia in small mesenteric arteries. **Crit. Care. Med.** 37(5): 1716-1723. 2009;

DAL-SECCO, D; DALBO, S; LAUTHERBACH, NES; GAVA, FN; CELES, MRN; BENEDET, PO; SOUZA, AH; ROSSI, MA; KETTELHUT, IC; PUPO, AS; CUNHA, FQ; ASSREUY. Cardiac hyporesponsiveness in severe sepsis is associated with nitric oxide-dependent activation of G-protein receptor kinase. **Am. J. Physiol. Heart. Cir. Physiol.** 313:1.2017.

DEWITTE, A; LEPREUX, S; VILLENEUVE, J; RIGOTHIER, C; COMBE, C; OUATTARA, A; RIPOCHE, J. Blood platelets and sepsis pathophysiology: a new therapeutic prospect in critical ill patients? **Ann. Intensive Care.** 7(115):1-18. 2017;

DE YOUNG, L.M; KHEIFETS, J.B; BALLARON, S.J. *et al.* Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions.** 26. 335–341. 1989;

DREWRY, A.M; FULLER, B.F; SKRUPKY, L.P; HOTCHKISS, R.S. The presence of hypothermia within 24 hours of sepsis diagnosis predicts persistent lymphopenia. **Crit. Care Med.** 43(6):1165-1169. 2015;

DUBIN, A; LATTANZIO, B; GATTI, L. The spectrum of cardiovascular effects of dobutamina – from healthy subjects to septic shock patients. **Rev. Bras. Ter. Intensiva.** 29(4):490-498. 2017;

DUNSER, M.W; HASIBEDER, W.R. Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. **Clin. Med. Surg.** 24(5):293-316.2009;

DELLINGER, R.P. Cardiovascular management of septic shock. **Crit. Care Med.** V31.P.946–55. 2003;

DELLINGER, R.P; LEVY, M.M; RHODES, A; ANNANE,D; GERLACH, H; OPAL, S.M; SEVRANSKY, J.E et al., Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. **Intensive Care Med.** 39.165-228. 2013;

EHRMAN, R.R; SULLIVAN, A.N; FAVOT, M.J; SHERWIN, R.L; REYNOLDS, C.A; ABIDOV, A; LEVY, P.P. Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature. **Crit. Care.** 22(112):1-14. 2018;

FANG, F; CHEN, H; WIRDEFELDT, K; RONNEVI, L; AL-CHALABI, A; PETERS, T.L; KAMEL, F; YE, W. Infection of the central nervous system, sepsis and amyotrophic lateral sclerosis. **PLoS ONE.** 12(6).1-6.2011;

FENTON, K.E; PARKER, M.M. Cardiac function and dysfunction in sepsis. **Clin. Chest. Med.** 37(2). 2016;

FERNANDES, D; ASSREUY, J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. **Shock.** 30(7). 10-13. 2008;

FREITAS, A.C.S; FIGUEIREDO, M.J; CAMPOS, E.C; SOAVE, D.F; RAMOS, S.G; TANOWITZ, H.B; CELES, M.R. Activation of Both the Calpain and Ubiquitin-Proteasome Systems Contributes to Septic Cardiomyopathy through Dystrophin Loss/Disruption and mTOR Inhibition. **PLoS One.** 23.1-14. 2016;

FRY D.E; Sepsis, Systemic Inflammatory Response, and Multiple Organ Dysfunction: The Mystery Continues. **Am. Surg.** 78(1):1-8. 2012;

GIFFONI, R.T; TORRES, R.M. Brief history of electrocardiography. **Rev. Med. Minas Gerais.** 20(2). 263-270. 2009;

GRAZIOSI, P. Análise ecocardiográfica da função diastólica do ventrículo esquerdo na hipertensão Arterial. **HiperAtivo.** 3. 175-188. 1998;

- GUCYETMEZ, B; ATALAN, H.K. C-reactive protein and hemograma parameters for the non-sepsis systemic inflammatory response syndrome and sepsis: what do they mean? **PLoS One**. 11(2): 1-9. 2016;
- GOTTSCHALL, C.A.M. 1929-2009: 80 anos de cateterismo cardíaco – Uma História dentro da história. **Rev. Bras. Cardiol. Invas.**17(2).146-268. 2009;
- GODDARD, C.M; ALLARD, M.F; HOGG, J.C; WALLEY, K.R. Myocardial morphometric changes related to decreased contractility after endotoxin. **Am. J. Physiol.** 270.1446-1452. 1996;
- GOODWIN, A.J; RICE, D.A; SIMPSON, K.N; FORD, D.W. et al. Frequency, cost, and risk factors of readmissions among severe sepsis survivors. **Crit. Care Med.**43(4). 738-746. 2015;
- HABIG, W.H; MICHAEL, J.P; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** 249. 7130-7139. 1974
- HOFFMAN, M; KYRIAZIS, L.D; LUCHESE, A.M; LUCIA, C; PIEDEPAMLUMBO, M. et al., Myocardial strain and cardiac output are preferable measurements for cardiac dysfunction and can predict mortality in septic mice. **J. Am. Heart. Assoc.** 8(10):1-20. 2019;
- HOTCHKISS, R; KARL, I.E. The Pathophysiology and treatment of sepsis. **N. Engl. J. Med.** 348(2):138-50. 2003;
- HUANG, C.Y; DANIELS, R; LEMBRO, A; HARTOG, C. et al. Life after sepsis: an international survey of survivors to understand the post-sepsis syndrome. **Int. J. Qual. Health Care.**1-8. 2018;
- IBA, T; LEVY, J.H; RAJ, A; WARKENTIN, T.E. Advance in the management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. **JCM.** 8(5):1-16. 2019;
- INSTITUTO LATINO AMERICANO DA SEPSE. **Sepse: um problema de saúde pública.** Disponível em:<<http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/ferramentas/livro-sepse-um-problema-de-saude-publica-cfm-ilas.pdf>>. Acesso em: 06 Abril, 2017;
- JARDIN, F; THIERRY, F; BERNARD, P; YANN, L; ANTOINE V.V; ALAIN, B; JEAN-PIERR, B. Persist preload defect in severe sepsis despite fluid loading: A longitudinal echocardiographic Study in patients with septic shock. **Chest.**116(5).1254-59. 1999;
- JASHARI, H; RYDBERG, A; IBRAHIMI, P; BAJRAKTARI, G. et al. Left ventricular response to pressure afterload in children: Aortic stenosis and coarctation. **Int. J. Cardiol.** 178. 203-209. 2015;
- JIANG, Z.Y; WOOLLARD, A.C.S; WOLFF, S.P; Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids.** 26(10). 853-856. 1991;

JOHNSON, A. A quick reference on respiratory alkalosis. **Vet. Clin. Small Anim.** 47(2). 181-84. 2016;

JUNIOR, AAJ; CHIARELLO, PG; BERNARDES, MSM; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. **Med. Ribeirão Preto.** 31: 434-449. 1998;

KAROOWNI, W; CHATTERJEE, K. Diastolic heart failure: the current understanding and approach for management with focus on intensive care unit patients. **J. Intensive Care Med.** 39(3).119-127.2014;

KAKIHANA, Y; ITO, T; NAKAHARA, M; YAMAGUCHI, K. et al. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. **J. Intensive Care Med.** 4(22).2-10. 2016;

KIMMOUN, A; DUCROCQ, N; LEVY, B. Mechanisms of vascular hyporesponsiveness in septic shock. **Vascul. Pharmacol.** 11(2). 139-149. 2013;

KING, E.M; LIEU, C; KASASA, A; EWER, A.K; THANGARANTINAM, S. Hypoxia Associated with Early-onset Sepsis in Asymptomatic Newborns: A Feasibility Study in a Low-income Country. **Brit. J. Med. Med. Res.** 4(5):1115-1128. 2014;

KLENZAK, J; HIMMELFARB, J. Sepsis and the kidney. **Crit. Care Clin.** 21(2). 211-22. 2005;

KOPEL, E; KLEMPFNER, R; GOLDENBERG, I; SCHWAMMENTHAL, E. Estimating mortality in survivors of the acute coronary syndrome by the 4-drug score. **Cardiology.**127(2):83-89. 2014;

KUHTZ-BUSCHBECK, J.P.K; DRAKE-HOLLAND, A; NOBLE, M.I.M; LOHFF, B. et al. Rediscovery of Otto Frank's contribution to science. **J. of Molec. And Cell. Cardiol.**119.96-103. 2018;

KUMAR, A; THOTA, V; DEE, L; et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. **J. Exp. Med.**183: 949-58. 1996;

KUMAR, A; HAERY, C; PARRILO,J.E. Myocardial dysfunction in septic shock. **Crit. Care Clin.** 16(2):251-287. 2000;

LAMBDEN, S. Bench to bedside review: therapeutic modulation of nitric oxide in sepsis – an update. **Intensive Care Med. Exp.** 64(7). 1-14. 2019;

LAMIA, B; CHEMLA, D; RICHARD, C; TEBOUL, J.L. Clinical review: interpretation of arterial pressure wave in shock states. **Crit. Care.** 9. 601-606. 2005;

LANDESBERG, G; GILON, D; GEORGIEVA, Y.M.M; LEVIN, P.D; GOODNMAN, S; AVIDAN, A; BEERI, R; WEISSMAN, C; JAFFE, A.S; SPRUNG, C.L. Diastolic

dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. **Eur. Heart J.** 33 (7). 895–903. 2012;

LANSPA, M.J; GUTSCHE, A.R; WILSON, E.L; OLSEN, T.D; HIRSHBERG, E.L; et al., Application of a simplified definition of diastolic function in severe sepsis and septic shock. **Crit. Care.** 20:243. 2016;

LANSPA, M.J; OLSEN, T.D; WILSON, E.L; LEGUYADER, M.L; HIRSHBERG, E.L. et al., A simplified definition of diastolic function in sepsis, compared against standard definitions. **J. Intensive Care.** 7:14. 2019;

LELUBRE, C; VICENT, J.L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. **Nat. Rev. Nephrol.** 14. 417-27. 2018;

LEBLOND, A.L; KLINKERT, K; MARTIN, K; TURNER, E.C; KUMAR, A.H; BROWNE, T. Systemic and cardiac depletion of M2 macrophage through CSF-1R signaling inhibition alters cardiac function post myocardial infarction. **PLoS One.** 10(9):1-13. 2015;

LEVY, M.M; EVANS, L.E; RHODES, A. The surviving sepsis campaign bundle: 2018 update. **Intensive Care Med.** 44. 925-928. 2018;

LI, X; BECKER, K.A; ZHANG, Y. Ceramide in redox signaling and cardiovascular diseases. **Cell. Physiol. Biochem.** 26:41-48. 2010;

LIU, Y; YU, M; SHOU, S; CHAI, Y. Sepsis-induced cardiomyopathy: mechanisms and treatments. **Front. Immunol.** 8(1021).1-8. 2017;

LV, X; WANG, H. Pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction. **Military Med. Res.** 3(30). 2016;

MACHADO, H; GUERRA, M.O; PETERS, V.M. Implantação e padronização da técnica de aferição indireta da pressão arterial em ratos wistar da colônia do biotério do centro de biologia da reprodução (CBR). **Rev. Intedisciplin. Estud. Exp. Anim. Hum.** 2(2). 60-61. 2010;

MADGER, S. Volume and its relationship to cardiac output and venous return. **Crit. Care.** 217(20). 1-11. 2016;

MARIK, P.E; MONNET, X; TEBOUL, J.L. Hemodynamic parameters to guide fluid therapy. **Ann. Intensive Care.** 1(1). 2011;

MARKLUND, S; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur. J. Biochem.** 47. 469-474. 1974;

MASSEY, K.D; STRIETER, R.M; KUNKEL, S.L; DANFORTH, J.M; STANDIFORD, T.J. Cardiac myocytes release leukocyte-stimulating factors. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 269(3). 1995;

MEDEIROS, V.F.L.P; AZEVEDO, I.M; CARVALHO, M.D.F; EGITO, E.S.T. et al. Effect of coconut water and simvastation in the treatment of sepsis and hemorrhagic shock in rats. **Acta. Cir. Bras.**31(12).2016;

MESQUITA, E.T; MARCHESI, L.D; DIAS, D.W; BARBEITO, A.B et al. Prêmios Nobel: contribuições para a cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**105(2).188-196 .2015;

MERX, M.W; WEBER, M.D. Sepsis and the heart. **Circ. Res. Suppl.**.116.793-802.2007;

MODI, A; ATAM, V; JAIN, N; GUTCH, M; VERMA, R. The etiological diagnosis and outcome in patients of acute febrile encephalopathy: A prospective observational study at tertiary care center. **Neurol Indi. J. Nuerol. Soc. India.** 60:168-73. 2012;

NATALI, A.J. Efeitos do exercício crônico sobre os miócitos cardíacos: uma revisão das adaptações mecânicas. **Rev. Bras. Ci. Mov.**12(1). 91-96. 2004;

NAHRENDORF, M; PITTET, M.J; SWIRSKI, F.K. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. **Circulation.** 121(22):2437-2445.2010;

NOBRE, F. Medida da pressão arterial do século XIX ao XXI. **Rev. Bras. Hipertens.** 9(1).11-12.2002;

OH, G.C; CHO, H. Blood pressure and heart failure. **J. Clin. Hyperten.** 26(1):1-8. 2020;

OKOSHI, K; FIORETTO, J.R; BONATTO, R.C; TORNERO, M.T.T. et al. Influência da elevação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo sobre os valores da primeira derivada temporal da pressão ventricular (dP/dt). **Arq. Bras. Cardiol.** 73(1).37-41.1999;

O'SULLIVAN, D; KELLY, B; PEARCE, E.L. When Hexojinase gets NAG-ing feeling. **Cell Metab.** 24:198-199. 2016;

PACHER, P; NAGAYAMA, T; MUKHOPADHYAY, P; BATKAI, S; KASS, D.A. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. **Nat. Protoc.** 3. 1422-1434. 2008;

PARKER, M.M.; SHELHAMER, J.H.; BACHARACH, S.L.; GREEN, M.V.; NATANSON, C.; FREDERICK, T.M.; DAMSKE, B.A.; PARRILLO, J.E. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. **Ann. Intern. Med.** 100:4. 83-90. 1984;

PEAK, S.L; DELANEY, A; BAILEY, M; BELLOMO, R. et al. Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. **N. Engl. J. Med.** 371.1496-1506. 2014;

PEANA, D; DOMEIER, T.L. Cardiomyocyte Ca²⁺ homeostasis as a therapeutic target in heart failure with reduced and preserved fraction. **Curr. Opin. Pharmacol.** 33:17-26. 2017;

PETERS, S.M; MICHEL, C. The RhoA/Rho kinase pathway in the myocardium. **Cardiovasc. Res.** 75(1):3-4. 2007;

PAULUS W.J.; TSCHOPE, C; SANDERSON, J.E; FLACHSKAMPF, F.A. et al. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by heart failure and echocardiography associations of the European society of cardiology. **Eur. Heart J.** 28(20). 2539-2550. 2007;

PINTO, A.S; OLIVEIRA. B.M.R; BOTONI, F.A; RIBEIRO, A.L.P. et al. Disfunção miocárdica em pacientes chagásicos sem cardiopatia aparente. **Arq. Bras. Cardiol.** 89(6). 349-354. 2007;

PLOTNIKOV, E.Y; PEVZNER, I.B; ZOROVA, L.D; CHERNIKOV, V.P; PRUSOV, A.N; KIREEV, I.I; SILACHEV, D.N; SKULACHEV, V.P; ZOROV, D.B. Mitochondrial Damage and Mitochondria-Targeted Antioxidant Protection in LPS-Induced Acute Kidney Injury. **Antioxidants.** 8(6):176. 2019;

PRESCOTT, H.C; ANGUS, D.C. Enhancing recovery from sepsis: A review. **JAMA.** 319(1). 62.75. 2018;

PRESCOTT, H.C; OSTERHOLZER, J.J; LANGA, K.M; ANGUS, D.C. et al. Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. **BMJ.**353.1-8. 2016;

POELAERT, C; DECLERCK, D; VOGELAERS, F; COLARDYN, C. et al. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. **Intensive Care med.** 23. 553-560. 1997;

PREAU, S; DELGUSTE, F; YU, Y; REMY-JOUET, I; RICHARD, V; et al., Endotoxemia engages the RhoA kinase pathway to impair Cardiac Funcion by altering cytoskeleton, mitochondrial fission, and autophagy. **ARS.** 24(10): 1-45. 2016;

PRUCHA, M; BELLINGAN, G; ZAZULA, R. Sepsis biomarkers. **Clin. Chim. Acta.** 440(2):97-103. 2015;

PULIDO, J.N; AFESSA, B; MASAKI, M; YUASA, T. et al. Clinical spectrum, frequency, and significance of myocardial dysfunction in severe sepsis and septic shock. **Mayo Clin. Proc.**87(7).620-628. 2012;

REIS, N.B. Evolução histórica da cardiologia no Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.** 46(6).371-386.1986;

QUARTIN, A.A; SCHEIN, R.M.H; KETT, D.H; PEDUZZI, P.N. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. **JAMA.** 277(13):1058-1063. 1997;

REES, D,D; CELLEK, S; PALMER, R.M.J; MONCADO, S. Dexamethasone prevents the induction of nitric oxide synthase and the associated effects on the vascular tone: na insight into endotoxic shock. *Biochem.Biophys. Rev. Commun.* 173. 541-47. 1990;

REGUEIRA, T; ANDRESEN, M; MERCADO, M; DOWNEY, P. Physiopathology of acute renal failure during sepsis. *Med. Intensiva.* 35(7). 424-32. 2011;

RITTIRSCH, D; HUBER-LANG, M.S; FLIERL, M.A; WARD, P.A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* 4(1). 31-36. 2009;

ROCHA, L.L; PESSOA, C.M.S; CORRÊA, T.D et al. Conceitos atuais sobre suporte hemodinâmico e terapia em choque séptico. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 65(5).395-402. 2014;

RHODES, A; EVANS, L.E; ALHAZZANI, W. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 43. 304–377. 2017.

ROMAN, R.M; WENDLAND, A.E; POLANCZYK, C.A. Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice. *SBC.* 91(1):e11-e18. 2007;

ROSSI, M. A; CELES, M.R.N; PRADO, C.M; SAGGIORO, F.P. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. *Shock:* 27(1). 2007;

RUDGER, A; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit. Care Med.* 35(6). 1599-1608. 2007;

RUSSEL, J.A; RUSH, B. BOYD, J. Pathophysiology of septic shock. *Crit. Care Clin.* 34. 43-61. 2018;

SANFILIPPO, F; CORREDOR, C; FLETCHER, N; LANDESBURG, G. et al. Diastolic dysfunction and mortality in septic patients: a systemic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 41(6). 1004-1013. 2015;

SELA, G; LANDESBURG, A. The external work-pressure time integral relationships and the afterload dependence of frank-starling mechanism. *JMCC.* 47(4):544-551. 2009;

SEDLAK, J; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25. 192-205. 1968;

SHIELS, H; WHITE, E. Commentary the Frank-Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. *JEB.* 211:2005-2015. 2008;

SILVA, FP, VELASCO, IT. *Sepse.* Barueri: Manole. p. 214-42. 2007;

SCHILLER, P; VIKHOLM, P; HELLGREN, L. A modified glenn shunt reduces right ventricular stroke work during left ventricular assist device therapy. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.** 49(16). 795-801. 2015;

SHIH, C.J; CHAO, P.W; OU, S.M; CHEN, Y.T. Long-term risk of cardiovascular events in patients with chronic kidney disease who have survived sepsis: a nationwide cohort study. **J. Am. Heart Assoc.** 6. 1-8. 2017;

SIMPSON, N; LAMONTAGNE, F; SHANKAR-HARI, M. Septic shock resuscitation in the first hour. **Crit. Care.** 23(6). 561-566. 2017;

SINGER, M; DEUTSCHMAN, C.S; SEYMOUR, C.W; SHANKAR-HARI, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA.** 315(8). 801-810. 2016;

SKRZYPIEC-SPRING, M; GROTHUS, B; SZELAG, A; SCHULZ, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff – Still viable in the new millennium. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.** 55.113-126. 2006;

SONG, S; BURLESON, P.D; PASSO, S; MESSINA, E.J. Cardiac structure and function in human: a new cardiovascular physiology laboratory. **Adv. Physiol. Educ.** 33.221-229. 2009;

SOUZA, P; GUARIDO, K.L; SCHESCHOWITSCH, K; SILVA, L.M; WERNER, M.F; ASSREUY, J; SILVA-SANTOS, J.E. Impaired vascular function in sepsis-surviving rats mediated by oxidative stress and Rho-kinase pathway. **Redox Biol.** 10. 140-147. 2016;

STARLING, E.H. The Linacre lecture on the law of the heart. New York. **Longmans Green & Co.** 1918;

STECKERT, A.V; CASTRO, A.A; QUEVEDO, J; DAL-PIZZOL, F. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with N-acetylcysteine, vitamins and statins. **Cur. Neovasc. Res.** 11. 83-90. 2014;

STURM,T; LEIBLEIN, J; SCHNEIDER-LINDNER, V; Association of microcirculation, macrocirculation, and severity of illness in septic shock: a prospective observational study to identify microcirculatory targets potentially suitable for guidance of hemodynamic therapy. **Clin. Med. Surg.** 33(4). 1-11. 2016;

SQUARA, P; HOLLENBERG, S; PAYEN, D. Reconsidering vasopressors for cardiogenic shock. Everything should be made as simple as possible, but not simple. **Chest.** 156(2). 392-401. 2019;

STODDARD, M.F; PEARSON, A.C; KERN, M.J; RATCLIFF, J. et al. Left Ventricular Diastolic Function: comparison of pulsed doppler echocardiographic and hemodynamic indexes in subjects with and without coronary artery disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**13(2). 327-336. 1989;

- TAJARERNMUANG, P; PHROMMINTIKUL, A; LIMSUKON, A; POTHIRAT, C; CHITAWATANARAT, K. The role of mean platelet volume as a predictor of mortality in critical ill patients: a systematic review and meta-analysis. **Crit. Care Res. Pract.** 1-8. 2016;
- TALLGREN, M; BÄCKLUND, M; HYNNINEN, M. Accuracy of sequential organ failure assessment (SOFA) scoring in clinical practice. **Acta Anaesthesiol. Scand.** 53(1):39–45. 2009;
- TARIQ, S; ARONOW, W.S. Use of inotropic agents in treatment of systolic heart failure. **Int. J. Mol. Sci.** 16(2):29060-29068. 2015;
- TUCCI, P.J.F. contração cardíaca – As bases fisiológicas do mecanismo de frank-starling. **Arq. Bras. Cardiol.** 39(5). 337-344. 1982;
- VALLABHAJOSYULA, S; JENTZER, J; GESKE, J.B; KUMER, M. et al. new-onset heart failure and mortality in hospital survivors of sepsis-related left ventricular dysfunction. **Shock.** 49(2). 144-149. 2018;
- VANDERLEI, L.C.M; PASTRE, C.M; HOSHI, R.A; VARVALHO, T.D. et al. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Rev. Bras. Circ. Cardiovasc.**24(2). 205-217. 2009;
- VAEZ, H; RAMESHRAD, M; NAJAFI, M; BARAR, J; BERZAGARI, A; GARJANI, A. Cardioprotective effect of metformin in lipopolysaccharide-induced sepsis via suppression of toll-like receptor 4 (tlr4) in heart. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 772(5): 115-123. 2016;
- VENTETUOLO, C.R; KLINGER, J.R. Management of acute right ventricular failure in the intensive care unit. **Annals ATS.** 11(5). 811-822. 2014;
- VERDONK, F; BLET, A; MEBAZAA, A. The new sepsis definition limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis. **Cur. Opin. In Anaesthesiol.** 30(2):200-204. 2017;
- VICTOR, V.M; ESPLUGUES, J.V; HERNANDEZ-MIJARES, A; MILAGROS, R. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: A potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. **Infec. Disord. – drug targets.** 9(4):376-389. 2009;
- VIELLARD-BARON, A; CECCONI, M. Understanding cardiac failure in sepsis. **Intensive Care Med.**4:1560–3. 2014;
- VINCENT, J.L. understanding cardiac output. **Crit. Care.**12(4).1-3. 2008;
- WANG, T; GROSS, C; DESAI, A.A;ZEMSKO, E; WU, X. et al., Endothelial cell signaling and ventilator-induced lung injury: molecular mechanisms, genomic analysis, and therapeutic targets. **Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.** 312:L452-L456. 2017;

WANG, Y; YANG, W; ZHAO, X; ZHANG, R. Experimental study of the protective effect of simvastatin on lung injury in rats with sepsis. **Inflamm.** 41: 104-113. 2018;

WHERWEIN, R.A; ORER, H.S; BARMAN, S.M. Overview of the anatomy, physiology, and pharmacology of the autonomic nervous system. **Compr. Physiol.** 6(3):1239-1278. 2016;

WIER, W.G; MORGAN, K.G. α 1-Adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** 150:91-139. 2003;

WOZNICA, E.A; MALGORZATA, I; WOZNICA, R.K; LYSENKO, L. Liver dysfunction in sepsis. **Adv. Clin. Exp. Med.** 27(4). 547-51. 2018;

WU, M; TSOU, P; WANG, Y; LEE, M.G; CHAO, C.C.T et al., Impact of post-sepsis cardiovascular complications on mortality in sepsis survivors: a population-based study. **Crit. Care.** 293(23). 1-11. 2019;

WU, L.L; TANG, C; LIU, M.S. Hyper- and hypocardiodynamic states are associated with externalization and internalization, respectively, of alpha-adrenergic receptors in rat heart during sepsis. **Shock.**7(5):318-323. 1997;

YENDE, S.; LINDE-ZWIRBLE, W.; MAYR, F.; WEISSFELD, L.A.; REIS, S.; ANGUS, D.C. Risk of cardiovascular events in survivors of severe sepsis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** V189. N9. p1065-74. Maio. 2014;

YIN, L; HOU, L; LIY, R; WANG, J; HU, Y. ET AL., Efficacy of norepinephrine, dopamine or vasopressor in the management of septic shock and severe sepsis: a meta-analysis. **Int. J. Clin. Exp. Med.** 11(11): 11383-11395. 2018;

ZAMPIERI, F.G; RANZANI, O.T; SABATOSKI, V; SOUZA, H.P; BARBEIRO, H ET AL., An increase in mean platelet volume after admission is associated with higher mortality in critically ill patients. **Ann. Intensive Care.** 4:20. 2014;

ZANOTTI-CAVAZZONI, S.L; HOLLENBERG, S.M. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. **Crit. Care.** 15(5):392-387. 2009;

ZENG, B; CHENG, L; HAO, F. Mechanism of threshold pressure gradient reduction by surfactant. **Phys. Numer. Simul. Geotec. Engin.** 15: 61-65. 2014;

ZHANG, L N; WANG X, T; AI, Y H; GUO, Q L; HUANG, L; LIU, Z Y et al. Epidemiological features and risk factors of sepsis-associated encephalopathy in intensive care unit patients: **Chinese Med.** 2008-2011. 2012;

ZHANG, K; MAO, X; FANG, N; JIN, Y. et al. Impaired long-term quality of life in survivors of severe sepsis. **Anaesthetist.** 62:995-1002.2013;

APÊNDICE A

TABELA 5. Função da bomba cardíaca de animais sobreviventes à sepse antes e após a utilização de drogas vasoativas

	Fenilefrina		Dobutamina	
	(30 nmol/kg, e.v.)		(30 nmol/kg, e.v.)	
	<i>Controle</i> (n = 7)	<i>CLP 30 dias</i> (n = 6)	<i>Controle</i> (n = 7)	<i>CLP 30 dias</i> (n = 6)
Vmax (L)				
<i>Valores Basais</i>	252,0 ± 15,3	132,6 ± 18,6*	229,4 ± 30,6	131,3 ± 15,8
<i>Valores Máximos</i>	301,9 ± 19,5	181,5 ± 31,0	258,1 ± 27,5	150,4 ± 14,4
<i>Delta</i>	49,9 ± 14,1	48,3 ± 16,9	28,8 ± 12,7	19,1 ± 6,4
Vmin (L)				
<i>Valores Basais</i>	117,2 ± 11,2	75,5 ± 27,3*	123,3 ± 15,1	72,9 ± 24,8
<i>Valores Máximos</i>	215,7 ± 16,9	96,7 ± 30,9	153,1 ± 15,4	83,1 ± 27,2
<i>Delta</i>	98,5 ± 10,6	21,1 ± 7,0*	29,8 ± 10,9	10,2 ± 5,5
Ves (L)				
<i>Valores Basais</i>	127,4 ± 12,3	103,6 ± 21,9	129,9 ± 16,4	97,9 ± 20,1*
<i>Valores Máximos</i>	224,3 ± 19,2	131,9 ± 19,9	158,1 ± 16,3	108,2 ± 16,6
<i>Delta</i>	96,7 ± 11,1	29,2 ± 8,8*	28,1 ± 10,9	10,3 ± 8,6

Pmin (mmHg)				
<i>Valores Basais</i>	0,7 ± 2,0	21,3 ± 13,6	4,8 ± 1,9	21,1 ± 12,7
<i>Valores Máximo</i>	5,8 ± 1,9	35,9 ± 21,0	4,1 ± 2,1	28,1 ± 18,7
<i>Delta</i>	5,1 ± 1,5	14,5 ± 7,5	-0,7 ± 0,6	7,1 ± 6,0
Pmean (mmHg)				
<i>Valores Basais</i>	37,1 ± 3,9	169,4 ± 54,9*	159,3 ± 50,2	42,3 ± 3,6*
<i>Valores Máximos</i>	73,7 ± 9,1	207,4 ± 56,5	57,1 ± 4,2	208,1 ± 64,1
<i>Delta</i>	36,5 ± 7,3	37,9 ± 9,9	14,7 ± 0,8	48,8 ± 14,8*
Pdev (mmHg)				
<i>Valores Basais</i>	102,1 ± 3,8	71,8 ± 3,8	106,4 ± 2,1	68,8 ± 19,5
<i>Valores Máximos</i>	155,8 ± 15,4	98,3 ± 33,3	154,1 ± 11,1	86,2 ± 27,4
<i>Delta</i>	53,7 ± 14,8	26,5 ± 15,2	47,6 ± 9,3	17,3 ± 8,8*
Pes (mmHg)				
<i>Valores Basais</i>	86,5 ± 4,9	56,7 ± 23,5	99,5 ± 5,4	56,1 ± 23,2*
<i>Valores Máximos</i>	158,6 ± 14,9	87,2 ± 38,8	154,1 ± 13,4	75,2 ± 31,6
<i>Delta</i>	72,0 ± 14,6	30,5 ± 18,1	54,6 ± 9,4	19,1 ± 9,6*
Ea (mmHg/L)				
<i>Valores Basais</i>	0,7 ± 0,1	3,7 ± 0,4 *	1,5 ± 0,5	3,7 ± 0,5
<i>Valores Máximos</i>	1,9 ± 0,1	8,4 ± 2,3	1,9 ± 0,4	4,4 ± 0,6
<i>Delta</i>	1,2 ± 0,2	4,7 ± 2,5	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,3

dP/dtmin (mmHg/s)

<i>Valores Basais</i>	-2556,4 ± 408,4	1237,1 ± 2914,8*	-5309,6 ± 451,4	1390,0 ± 2753
<i>Valores Máximos</i>	-8129,1 ± 940,1	344,8 ± 3029,1	-8349,2 ± 571,4	-1949,0 ± 2833,6
<i>Delta</i>	-2873 ± 1190	-892,3 ± 1600	-2813 ± 524,2	-3339 ± 1507

dV/dt min (mmHg)

<i>Valores Basais</i>	-3701,1 ± 417,8	42,6 ± 693,4	-2910,6 ± 310,9	143,9 ± 594,7*
<i>Valores Máximos</i>	-2509,5 ± 157,1	-78,4 ± 880,1	-3759,0 ± 505,3	31,3 ± 681,6
<i>Delta</i>	1378 ± 467	-121 ± 208,9*	-848,4 ± 422,3	-112,6 ± 117,6

**P@dV/dVmax
(mmHg)**

<i>Valores Basais</i>	68,9 ± 20,2	13,6 ± 3,9*	76,5 ± 19,8	9,5 ± 7,7*
<i>Valores Máximos</i>	130,2 ± 9,9	8,1 ± 4,3	55,4 ± 30,4	23,2 ± 7,7
<i>Delta</i>	61,2 ± 23,0	-5,4 ± 6,1*	-21,1 ± 31,5	13,6 ± 8,7

**P@dV/dVmin
(mmHg)**

<i>Valores Basais</i>	62,7 ± 4,6	38,1 ± 12,5*	72,7 ± 5,4	35,3 ± 14,1*
<i>Valores Máximos</i>	97,8 ± 8,7	37,2 ± 25,8	103,5 ± 5,6	57,1 ± 16,2
<i>Delta</i>	35,2 ± 9,7	-0,7 ± 15,7	30,8 ± 1,7	21,7 ± 5,7

V@dP/dtmax**(mmHg)**

<i>Valores Basais</i>	236,2 ± 13,4	75,5 ± 36,3*	230,1 ± 28,2	73,8 ± 35,1*
<i>Valores Máximos</i>	291,5 ± 19,8	101,4 ± 52,7	230,7 ± 3,8	75,8 ± 36,6
<i>Delta</i>	55,2 ± 12,5	25,8 ± 19,2	0,5 ± 16,4	1,9 ± 2,2

V@dP/dtmin (mmHg)

<i>Valores Basais</i>	124,2 ± 13,2	67,7 ± 28,3*	104,4 ± 20,0	67,2 ± 27,2*
<i>Valores Máximos</i>	226,1 ± 19,1	81,3 ± 33,6	144,9 ± 15,9	65,2 ± 26,9
<i>Delta</i>	101,8 ± 12,1	13,5 ± 5,7*	4,5 ± 20,1	-2,0 ± 3,1

V_{max} – volume máximo, V_{min} – volume mínimo, V_{es} – volume no final da sístole, P_{min} – pressão mínima, P_{mean} – pressão média, P_{dev} – pressão no final da diástole ventricular, P_{es} – pressão sistólica final, E_a – elastância arterial, dP/dT_{min} – derivada da pressão pelo tempo mínimo, dV/dt_{min} - derivação do volume pelo tempo mínimo, $P@dV/dt_{max}$ - pressão na derivação do volume pelo tempo máximo, $P@dV/dt_{min}$ - pressão na derivação do volume pelo tempo mínimo, $V@dP/dt_{max}$ - volume na derivação da pressão pelo tempo máximo e $V@dP/dt_{min}$ - volume na derivação da pressão pelo tempo mínimo. Os resultados representam a média ± EPM. A análise utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indicam $P < 0,05$.

APÊNDICE B

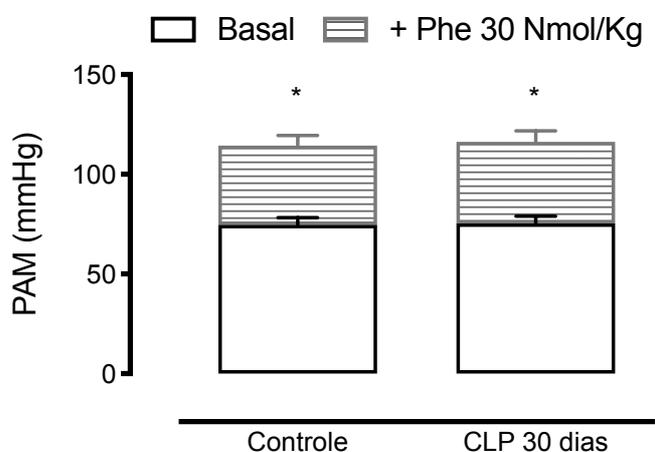


Figura 18: Efeitos da fenilefrina na pressão arterial média de animais sobreviventes à sepse. A figura apresenta o grupo controle e CLP 30 dias, as barras brancas representam a pressão média arterial média basal e as barras listradas a pressão arterial média após a utilização de fenilefrina na dose de 30 nmol/Kg. Os dados nos mostram que há diferença entre os valores basais e após a fenilefrina e que não há diferença da resposta entre os grupos. Os dados foram representados a partir da média \pm EPM de seis animais por grupo. A análise estatística foi feita de duas maneiras, comparando o parâmetro basal com seu respectivo controle, utilizando o teste *t* de *Student* e comparando a resposta entre os diferentes grupos, utilizando a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * Indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.