

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

**Função e reatividade cardíaca *in situ* na sepse em ratos:
diferenças entre gêneros e modelos experimentais**

RONALD PAIVA MORENO GONÇALVES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis, 06 de novembro de 2014

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

Gonçalves, Ronald Paiva Moreno

Função e reatividade cardíaca in situ na sepse em ratos :
diferenças entre gêneros e modelos experimentais / Ronald
Paiva Moreno Gonçalves ; orientador, José Eduardo da Silva
Santos ; coorientador, Jamil Assreuy. - Florianópolis, SC,
2014.

172 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Modelos de sepse. 3. Disfunção
miocárdica. 4. Cateter de condutância pressão-volume. 5.
Cálcio. I. da Silva Santos, José Eduardo. II. Assreuy,
Jamil. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

“Função e reatividade cardíaca *in situ* na sepse em ratos: diferenças entre gêneros e modelos experimentais”

Por

Ronald Paiva Moreno Gonçalves

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

Dr(a) José Eduardo da Silva Santos (FMC/CCB/UFSC)

Banca examinadora:

Dr(a) Rubens Fazan (Fisiologia/FMRP/USP)

Dr(a) Edson Antunes (FMC/UNICAMP)

Dr(a) Áurea Elizabeth Linder (FMC/CCB/UFSC)

Dr(a) Viviane de Menezes Caceres (Fisioterapia/Biociências/UFSC)

Dr(a) Giles Alexander Rae (FMC/CCB/UFSC)

Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 06 de novembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Eduardo da Silva Santos pela oportunidade de realização deste trabalho e pela sempre presente orientação ao longo destes anos, possibilitando enriquecedores momentos de discussão e aprendizado.

Ao Professor Dr. Jamil Assreuy também pela oportunidade e confiança na realização deste trabalho e pela sempre generosa e educada atenção oferecida.

Ao Professor Dr. Giles A. Rae, pelas excelentes aulas propiciando agradáveis discussões sobre farmacologia e pela possibilidade de utilização de seu laboratório para a realização de experimentos.

Aos queridos amigos Kyrton Rocha e Dorivalda Vieira pela generosidade e gentileza em me oferecerem moradia e me acolherem como um membro da família; pelo apoio e pelos agradáveis momentos ao longo destes anos.

À Gladys Rocha pelos momentos de descontração, incentivo e importantes conselhos.

À Bruna da Rosa Maggi pela atenção sempre muito generosa e contribuição para que a minha vinda para o Programa de Farmacologia se concretizasse.

Às colegas Alessandra Martini e Stefânia Forner pela agradável amizade, ajuda nos momentos de necessidade e pela contribuição durante esses anos.

Aos meus colegas de laboratório, René Piornedo, Amanda Leitolis, Priscila de Souza, e em especial a Karla Lorena Guarido pela amizade, contribuição na realização deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos colegas Regina de Sordi, Elizabete Bóf, Gustavo Ramos e Muryel Gonçalves pela gentileza e ajuda em me receberem nos momentos iniciais dentro do laboratório.

Ao Edir Rezende pela amizade.

À Harlye Thomaz, ainda que distante, pela nobreza de sua ajuda e atenção nos momentos difíceis. Muito obrigado.

Aos meus pais Waldo e Rojane e minha irmã Verônica, por todo apoio, carinho, paciência e dedicação ao longo destes anos de distância.

À minha avó Aureni, meu avô Domingos (*in memoriam*) e meus tios Rozângela e Cláudio pelo apoio incondicional.

À técnica do laboratório de farmacologia cardiovascular e do óxido nítrico Adriane Madeira pela amizade, gentil atenção e colaboração com a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Lameb I e II, Chirle Ferreira, Demétrio Gomes Alves, Emily dos Santos e Vanessa da Silva pela ajuda para a realização de experimentos ao longo desses anos.

Aos demais funcionários do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Pedro Paulo de Souza do Biotério Setorial.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Capes, o CNPq e a FAPESC (1366/2010-8) pelo apoio financeiro, sem o qual o presente trabalho não teria sido possível.

***“Nada é tão nosso quanto os
nossos sonhos”.***

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

A sepse representa a principal causa de mortes em unidades de terapia intensiva. A disfunção cardíaca induzida pela sepse, ou miocardiopatia séptica (MIS), é considerada um fator de risco importante para a piora do prognóstico do paciente, pois favorece o surgimento do choque séptico. O tratamento do choque séptico é feito pela administração de drogas vasopressoras e inotrópicas positivas, principalmente a noradrenalina e dobutamina, as quais possuem elevada recomendação, porém reduzidas evidências científicas para o seu uso. Adicionalmente, observa-se que não há distinção de gênero no tratamento do choque séptico, a despeito de trabalhos demonstrarem evoluções divergentes nas miocardiopatias entre homens e mulheres. Sendo assim, no qual utilizamos um cateter de medida pressão-volume, inserido diretamente no ventrículo esquerdo dos animais anestesiados, demonstramos que ratos machos e fêmeas, submetidos ao modelo de sepse induzida pelo LPS, apresentam disfunções cardíacas discrepantes, pois apenas os machos tiveram um déficit contrátil sustentado. Ainda, encontramos que essa diferença pode ser, pelo menos em parte, explicada pela redução na expressão de receptores de rianodina, observada somente nos ratos machos. Na segunda parte deste estudo, avaliamos o perfil da função cardíaca e da resposta cardíaca de ratos sépticos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração de ceco (CLP), aos fármacos noradrenalina e dobutamina. Diferente do observado nos animais endotoxêmicos, apesar da hipotensão arterial e da morte de 50% dos animais após 48 h da cirurgia de CLP, não observamos alterações cardíacas substanciais nos mesmos, ao menos nos tempos analisados (24

e 48 h). Ambas as drogas, noradrenalina e dobutamina, corrigiram a pressão arterial, porém a dobutamina o fez às custas do aumento na frequência cardíaca, e da fração de ejeção, dP/dt_{max} e do trabalho sistólico, o que poderia favorecer maiores taxas de mortalidade. Finalmente, na terceira parte de nosso trabalho, comparamos o perfil de resposta cardíaca à administração de dobutamina em ratos com sepse induzida pelos modelos de LPS e CLP, bem como exploramos a relação das diferenças encontradas com a expressão de proteínas cardíacas responsáveis pela cinética do íon cálcio. A capacidade da dobutamina em elevar a frequência cardíaca, o débito cardíaco e a fração de ejeção mostrou-se reduzida no modelo LPS, quando comparada às respostas observadas em animais do grupo CLP. Tais divergências estiveram associadas à diminuição na expressão dos receptores de rianodina e da proteína SERCA nos animais LPS, e aumentos de rianodina, RhoA e receptor de IP3 somente nos animais CLP. Portanto, neste estudo demonstramos diferenças do perfil cardíaco de acordo com o gênero e modelo de sepse utilizado. Pela primeira vez observamos que as diferenças encontradas, em ambos os casos, ocorreram concomitantemente à mudanças na expressão de proteínas carreadoras do íon cálcio no coração. Esses resultados permitem especular que algumas inferências da literatura possam estar pautadas em resultados enviesados devido ao modelo e gênero utilizado para o estudo da MIS.

Palavras-chave: cirurgia de ligadura e perfuração do ceco; lipopolissacarídeo; choque séptico; disfunção miocárdica; cateter de condutância pressão-volume.

ABSTRACT

Sepsis is the leading cause of deaths in intensive care units. Sepsis-induced cardiac dysfunction or septic cardiomyopathy (SIC) is considered an important risk factor for the worsening of patient's prognosis. The treatment of septic shock is accomplished by administration of positive inotropic and vasopressor drugs, mainly norepinephrine and dobutamine which are highly recommended, despite reduced scientific evidence for benefices or risks. Additionally, gender distinction in the treatment of septic shock has not been addressed in previous experimental studies, although it has been demonstrated relevant difference in cardiomyopathies between men and women. Thus, using a pressure-volume catheter inserted in the left ventricle chamber of anesthetized rats, in the first part of our study we demonstrated that male and female rats subjected to the LPS model of sepsis, showed distinct cardiac dysfunction, with a more prolonged cardiac depression in males. Such difference may be explained by reduced expression of ryanodine receptors, observed only in male rats. We also, evaluated the basal function and cardiac responses to dobutamine and norepinephrine in septic male rats subjected to CLP. CLP presented hypotension 48 h after CLP surgery, but unlike endotoxemic rats CLP-induced sepsis did not generate exacerbated cardiac abnormalities, at least in the periods evaluated. Both norepinephrine and dobutamine were able to increase blood pressure to control levels. However, only dobutamine increased heart rate, ejection fraction, dP/dt_{max} and stroke work, which could favor higher mortality rates. Finally, we compared the cardiac responses to dobutamine in animals subjected to LPS and CLP models, as well as the possible

correlation with the expression of cardiac proteins involved in calcium traffic. LPS rats displayed diminished increase in heart rate, cardiac output and ejection fraction in response to dobutamine than animals subjected to the CLP model. We also found reduced expression of ryanodine receptors and SERCA protein in LPS animals, and increased ryanodine, IP3 receptor and RhoA protein in CLP animals. Therefore, in this study we were able to demonstrate differences in the cardiac profile accordingly to gender and model of sepsis evaluated. This is the first study suggesting that the differences in gender responses to sepsis, may be associated with differential changes in the expression of calcium regulatory proteins in the heart. These results allow us to speculate that some conclusions found in the literature regarding the MIS may be based on biased results obtained accordingly with the gender or the experimental model implemented.

Key words: cecal ligation puncture; lipopolysaccharide; septic shock; myocardial dysfunction; pressure-volume conductance catheter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diretrizes internacionais para o diagnóstico da sepse.....	26
Figura 2: Evolução patofisiológica da síndrome séptica.....	30
Figura 3: Mecanismos indutores da disfunção miocárdica na sepse.....	33
Figura 4: Estruturas envolvidas no tráfego de íon cálcio nos cardiomiócitos possivelmente alteradas durante a sepse.....	34
Figura 5: Figura representativa da formação de um campo elétrico no interior do ventrículo esquerdo pelo cateter de condutância pressão-volume e cateter modelo SPR-901 utilizado nos experimentos.....	39
Figura 6: Registro típico de alteração da condutância elétrica do <i>pool</i> sanguíneo intraventricular para o cálculo do volume paralelo indesejado.....	43
Figura 7: Esquema representativo do procedimento de cateterismo do ventrículo esquerdo com cateter de pressão-volume.....	54
Figura 8: Registros de curvas da dinâmica pressão e volume intraventricular, da pressão arterial sistêmica, eletrocardiografia e frequência cardíaca obtidas por meio de cateter de condutância pressão-volume.....	56
Figura 9: Diurese de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	70
Figura 10: Ingestão hídrica de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	71
Figura 11: Pressão arterial dos ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	74
Figura 12: Efeitos da fenilefrina na pressão arterial sistólica de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	76

Figura 13: Avaliação da bomba cardíaca em ratos machos e fêmeas com endotoxemia antes e após a administração de fenilefrina.....	80
Figura 14: Índices sistólicos do ventrículo esquerdo que são dependentes de volume em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	85
Figura 15: Índices sistólicos do ventrículo esquerdo independentes de volume em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	87
Figura 16: Índices diastólicos do ventrículo esquerdo em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	89
Figura 17: Volume sistólico final do ventrículo esquerdo em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	92
Figura 18: Mortalidade de ratos machos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração cecal.....	95
Figura 19: Pressão arterial sistólica, diastólica e média de ratos machos submetidos à cirurgia de CLP.....	97
Figura 20: Efeitos da noradrenalina e dobutamina na pressão arterial sistólica de ratos com choque séptico.....	99
Figura 21: Avaliação da bomba cardíaca em ratos machos com choque séptico antes e após a administração de noradrenalina e dobutamina.....	101
Figura 22: Índices sistólicos do ventrículo esquerdo que são dependentes de volume em ratos machos com choque séptico antes e após a administração de noradrenalina e dobutamina.....	103
Figura 23: Índices sistólicos do ventrículo esquerdo independentes de volume em ratos machos com choque séptico induzido pela cirurgia de CLP.....	105

Figura 24: Índices diastólicos do ventrículo esquerdo em ratos machos com choque séptico induzido pela cirurgia de CLP.....	106
Figura 25: Pressão arterial sistólica de ratos machos sépticos submetidos a administração de LPS ou cirurgia de CLP.....	108
Figura 26: Frequência cardíaca e débito cardíaco de ratos machos endotoxêmicos (LPS) ou sépticos (CLP) antes e após administração de dobutamina.....	110
Figura 27: Fração de ejeção e dp/dt_{max} de ratos machos endotoxêmicos (LPS) ou sépticos (CLP) antes e após administração de dobutamina.....	111
Figura 28: dp/dt_{min} e volume diastólico final de ratos machos endotoxêmicos (LPS) ou sépticos (CLP) antes e após administração de dobutamina.....	113
Figura 29: Expressão do receptor de rianodina em corações de ratos machos após administração de LPS e cirurgia de CLP.....	115
Figura 30: Expressão da SERCA em corações de ratos machos após administração de LPS e cirurgia de CLP.....	116
Figura 31: Expressão de RhoA em corações de ratos machos após administração de LPS e cirurgia de CLP.....	117
Figura 32: Expressão de IP3R em corações de ratos machos após administração de LPS e cirurgia de CLP.....	119
Figura 33: Hiporresponsividade a administração de fenilefrina em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	163
Figura 34: Hiporresponsividade à fenilefrina em anéis de aorta de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	164
Figura 35: Expressão do receptor de rianodina em corações de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	166
Figura 36: Expressão da SERCA em corações de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	167

Figura 37: Expressão de RhoA em corações de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	168
Figura 38: Expressão de fosfolambana (PLB) em corações de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	169
Figura 39: Expressão da forma fosforilada da proteína fosfolambana (P-PLB) em corações de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Temperatura corporal de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	69
Tabela 2: Perfil hematológico e urinário de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	73
Tabela 3: Análise inter-gênero da pressão arterial sistólica de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	75
Tabela 4: Análise inter-gênero da função de bomba cardíaca antes e após a administração de fenilefrina em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	78
Tabela 5: Comparação inter-gênero de índices sistólicos ventriculares dependentes de volume antes e após a administração de fenilefrina em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	82
Tabela 6: Análise inter-gênero de índices diastólicos do ventrículo esquerdo antes e depois da administração de fenilefrina em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	91
Tabela 7: Análise inter-gênero do volume sistólico final em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	94
Tabela 8: Análise hematológica de ratos machos submetidos à cirurgia de CLP.....	96
Tabela 9: Avaliação do peso úmido e peso seco pulmonar em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	165

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.: antes de Cristo

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico

CLP: cirurgia de ligadura e perfuração do ceco

dP/dt_{max}: derivada positiva da pressão intraventricular sobre o tempo

dP/dt_{min}: derivada negativa da pressão intraventricular sobre o tempo

dP/dt_{max} – EDV: relação de dP/dt_{max} com o volume diastólico final

EPM: erro padrão da média

ESPVR: *end systolic pressure-volume relationship* (relação pressão-volume ao final da sístole)

i.p: intraperitoneal

i.v: intravenoso

LPS: lipopolissacarídeo

MIS: miocardiopatia séptica

PBS: *phosphate buffered saline* (salina tamponada com fosfato)

PKA: proteína quinase dependente de AMPc

PRSW: *preload recruitable stroke work* (trabalho sistólico recrutado pela pré-carga)

P@dP/dt_{max}: pressão intraventricular em momento de dP/dt_{max}

rpm: rotações por minuto

Tau: tempo de relaxamento isovolumétrico

TBS-T: solução salina tris-tamponada com *tween 20*

UI: unidades internacionais

UTIs: Unidades de terapia intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. DEFINIÇÃO DE SEPSE.....	25
1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	28
1.3. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE.....	29
1.4. MIOCARDIOPATIA SÉPTICA (MIS).....	31
1.5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA MIS.....	37
1.6. AVALIAÇÃO FUNCIONAL <i>IN SITU</i> DO SISTEMA CARDIOVASCULAR ATRAVÉS DO CATETER DE CONDUTÂNCIA PRESSÃO-VOLUME – UMA BREVE EXPLICAÇÃO.....	39
1.7. CONTEXTUALIZAÇÃO DESTE ESTUDO NO CENÁRIO ATUAL DA MIS.....	44
2. OBJETIVOS.....	48
2.1. GERAL.....	48
2.2. ESPECÍFICOS.....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1. ANIMAIS.....	50
3.2. DROGAS E REAGENTES.....	50
3.3. AVALIAÇÃO DA DIURESE, DO pH URINÁRIO E DA INGESTÃO HÍDRICA.....	51
3.4. PROTOCOLOS ANESTÉSICOS.....	52
3.5. ANÁLISE <i>IN SITU</i> DA FUNÇÃO CARDÍACA PELO MODELO DE CATETER DE PRESSÃO E VOLUME.....	53
3.6. COLETA DE SANGUE PARA ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	57
3.7. DOSAGEM DE NITRITO E NITRATO (NO _x).....	58

3.8. IMUNOELETROFORESE.....	59
3.8.1. Coração.....	59
3.8.2. Preparo das amostras e dosagem de proteínas.....	59
3.8.3. Eletroforese e imunodeteccão.....	60
3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	61
3.9.1 PARTE 1: Comparação da funcionalidade cardíaca por análise <i>in situ</i> de ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo de choque endotóxico.....	61
3.9.1.1 Indução do choque endotóxico e escolha dos grupos experimentais.....	61
3.9.1.2 Avaliação hemodinâmica e da função cardíaca <i>in situ</i>	62
3.9.1.3 Avaliações da diurese, pH urinário, ingesta hídrica, hematológica e dosagens de NO _x	62
3.9.2 PARTE 2: Avaliação da funcionalidade cardíaca por análise <i>in situ</i> de ratos machos submetidos ao choque séptico.....	63
3.9.2.1 Indução do choque séptico.....	63
3.9.2.2 Avaliação da mortalidade e escolha dos grupos experimentais.....	64
3.9.2.3 Avaliação hemodinâmica e da função cardíaca <i>in situ</i>	64
3.9.2.4 Avaliação hematológica.....	65
3.9.3 PARTE 3: Comparação do perfil cardiodinâmico e de expressão das principais proteínas cardíacas responsáveis pelo tráfego do íon cálcio em ratos machos submetidos ao choque endotóxico ou séptico.....	66
3.9.3.1 Indução do choque endotóxico ou séptico e grupos experimentais.....	66

3.9.3.2	Avaliação hemodinâmica e da função cardíaca <i>in situ</i>	66
3.9.3.3	Expressão de proteínas cardíacas responsáveis pelo tráfego de íon cálcio.....	67
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
4	RESULTADOS.....	68
4.1	PARTE 1: COMPARAÇÃO DA FUNCIONALIDADE CARDÍACA POR ANÁLISE <i>IN SITU</i> DE RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO MODELO DE CHOQUE ENDOTÓXICO.....	68
4.1.1	Alterações de temperatura e laboratoriais de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.....	68
4.1.2	Confirmação do choque endotóxico em ratos machos e fêmeas submetidos à aplicação de LPS.....	74
4.1.3	Avaliação da responsividade cardiovascular (pressão arterial) à doses crescentes de fenilefrina durante o choque endotóxico.....	76
4.1.4	Comparação dos efeitos do choque endotóxico na funcionalidade cardíaca de ratos machos e fêmeas antes e após a administração de fenilefrina.....	77
4.2	PARTE 2: AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR <i>IN SITU</i> EM RATOS MACHOS SUBMETIDOS À CIRURGIA DE LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL (CLP).....	95
4.2.1	Mortalidade induzida pela técnica de CLP utilizada.....	95
4.2.2	Alterações hematológicas em ratos machos após cirurgia de CLP.....	96
4.2.3	Caracterização do choque séptico em ratos machos após cirurgia de CLP.....	97

4.2.4	Avaliação da responsividade cardiovascular (pressão arterial) a doses crescentes de noradrenalina e dobutamina.....	98
4.2.5	Efeitos do choque séptico na funcionalidade e reatividade cardiovascular às drogas noradrenalina e dobutamina.....	100
4.3	PARTE 3: DIFERENÇAS FUNCIONAIS E DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CARDÍACAS RESPONSÁVEIS PELO TRÁFEGO DO ÍON CÁLCIO EM RATOS MACHOS SUBMETIDOS AO CHOQUE ENDOTÓXICO E SÉPTICO.....	107
4.3.1	Comparação das alterações funcionais cardiovasculares e de resposta à dobutamina de acordo com diferentes modelos experimentais de sepse.....	107
4.3.2	Comparação da expressão das principais proteínas cardíacas responsáveis pelo tráfego do íon cálcio de acordo com diferentes modelos experimentais sepse.....	114
5	DISCUSSÃO.....	120
5.1	PARTE 1: DIFERENÇAS NA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR LIGADAS AO GÊNERO EM RATOS ENDOTOXÊMICOS.....	120
5.2	PARTE 2: PERFIL DE RESPOSTA CARDIOVASCULAR À CATECOLAMINAS EM RATOS MACHOS COM CHOQUE SÉPTICO.....	130
5.3	PARTE 3: DIFERENTES RESPOSTAS CARDÍACAS AO TRATAMENTO COM DOBUTAMINA DE ACORDO COM O MODELO DE SEPSE E	

CORRELAÇÃO COM ALTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS DO TRÁFEGO DO ÍON CÁLCIO.....	138
6 CONCLUSÕES.....	147
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
8 APÊNDICE.....	163
8.1 ÁREA SOB A CURVA DO EFEITO HIPERTENSOR DA FENILEFRINA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS COM ENDOTOXEMIA.....	163
8.2 CURVA CONCENTRAÇÃO RESPOSTA PARA FENILEFRINA EM ANÉIS DE AORTA ISOLADA DE RATOS MACHOS E FÊMEAS COM ENDOTOXEMIA.....	164
8.3 PESO ÚMIDO E PESO SECO DO PULMÃO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS COM ENDOTOXEMIA.....	164
8.4 DIFERENÇAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CARDÍACAS RESPONSÁVEIS PELO TRÁFEGO DO ÍON CÁLCIO ENTRE RATOS MACHOS E FÊMEAS COM ENDOTOXEMIA.....	166
8.5 ARTIGO PUBLICADO.....	171

1. INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DE SEPSE

Enquanto síndrome clínica, o termo sepse, refere-se ao conjunto de sinais e sintomas oriundos de um desequilíbrio do sistema imunológico inato e adaptativo, mais especificamente às respostas imune-humorais pró- e anti-inflamatórias, estimuladas por micro-organismos patogênicos. Desta maneira, sepse é genericamente descrita como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SRIS) determinada por processo(s) infeccioso(s), tais como aqueles ocasionados por vírus, fungos, parasitas e, especialmente, por bactérias, já que essas últimas apresentam elevada capacidade intrínseca de estimular o sistema imunológico do hospedeiro (LEVY et al., 2003). Desta forma, pacientes diagnosticados ou apenas sob suspeita clínica da presença de uma infecção e que tenham pelo menos dois critérios de inclusão para o diagnóstico da SRIS, devem ser considerados sépticos. Embora o termo sepse tenha sido introduzido por Hipócrates (460-370 a.C) somente em 1991 (com revisão em 2001) foi então estabelecido um consenso pelo Colégio Americano de Médicos Torácicos e pela Sociedade de Medicina Intensiva (do inglês *American College of Chest Physicians* e *Society of Critical Care Medicine*) acerca das definições e dos critérios a serem utilizados, tanto para o diagnóstico de SRIS, quanto para aqueles pacientes com sepse, conforme são descritos na Figura 1.

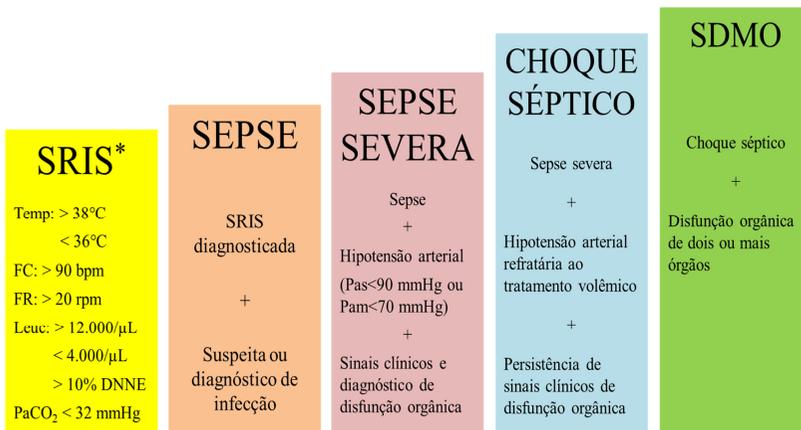


Figura 1: Esquema resumido das Diretrizes Internacionais para o diagnóstico da sepsis e a evolução de seu quadro clínico (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003). *Parâmetros clínicos e laboratoriais preconizados internacionalmente para o diagnóstico de pacientes humanos com síndrome de resposta inflamatória sistêmica. SRIS: síndrome de resposta inflamatória sistêmica; SDMO: síndrome de disfunção de múltiplos órgãos.

Os critérios de diagnóstico da sepsis levam em consideração, além da presença ou suspeita de uma infecção, alterações clínicas tais como febre ou hipotermia, taquicardia, taquipneia, alteração do estado mental (prostração ou *delirium*) e edema localizado ou generalizado. Também é recomendada a avaliação por exames laboratoriais, os quais sinalizam o estado inflamatório, tais como presença de leucocitose ou leucopenia, aumento de células polimorfonucleares imaturas ou bastonetes (> 10%) na circulação, e elevações nas concentrações plasmáticas da proteína-C reativa e procalcitonina (DELLINGER et al., 2008).

Além do termo sepse, outras terminologias também são internacionalmente empregadas de acordo com a evolução clínica do paciente séptico (Figura 1). São elas: I) a sepse severa, a qual é representada pela sepse associada a hipotensão arterial sistêmica (pressão arterial sistólica < 90 mmHg e/ou pressão arterial média < 70 mmHg), ou a presença de manifestação clínica e o diagnóstico de hipoperfusão com disfunção de um órgão previamente não acometido; II) o choque séptico, diagnosticado a partir da sepse severa em que a hipotensão arterial sistêmica demonstra-se refratária ao tratamento de reposição volêmica ressuscitativa com soluções cristaloides; III) a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), a qual decorre da disfunção de dois ou mais órgãos, necessitando de tratamento obrigatório, sem o qual a homeostasia não pode ser mantida (BONE et al., 1992). A insuficiência renal aguda e a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) são exemplos de SDMO, os quais estão comumente presentes na evolução da sepse, sendo igualmente responsáveis pela alta taxa de mortalidade (TSUSHIMA et al., 2009; FLYNN; CHOKKALINGAM MANI; MATHER, 2010).

As principais fontes de infecção desencadeadoras da sepse originam-se no sistema respiratório, no trato gastrointestinal, trato urinário, sistema tegumentar, ou por iatrogenia, através de ações intra-hospitalares (frequentemente após monitorizações invasivas). Sua incidência é desproporcionalmente mais elevada em crianças e idosos, sendo a idade considerada um fator preditivo independente de sobrevivência (ANGUS et al., 2001).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Apesar do grande número de publicações científicas e estudos acerca da sepse, a mesma permanece com taxas elevadas de mortalidade, sendo a décima causa de morte nos Estados Unidos, onde ocorreram mais de 250.000 mortes anuais, o que representa um óbito para cada quatro pacientes sépticos acamados em UTIs. Estima-se que o custo do tratamento de pessoas com sepse nos Estados Unidos ultrapasse a casa dos US\$ 17 bilhões ao ano (ANGUS et al., 2001). Dados do estudo BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) mostram que a incidência de sepse, sepse severa e choque séptico é de 61,4, 35,6 e 30 casos, respectivamente, para cada 1.000 pacientes atendidos por dia em UTIs brasileiras. As respectivas taxas de mortalidade foram de 34,7%, 47,3% e 52,2%, demonstrando elevações das mesmas de acordo com a severidade da evolução clínica (SILVA et al., 2004). Considerando-se a incidência próxima a 57 casos por 1.000 pacientes-dia no Brasil, a sepse representa o principal problema de saúde pública nas UTIs brasileiras, com um custo anual mínimo de US\$ 8,5 bilhões (SILVA et al., 2004; TELES et al., 2008). Ainda, segundo o último Relatório Nacional do Instituto Latino Americano de Sepse (www.sepsisnet.org; ano base 2014), a taxa de mortalidade observada nos hospitais públicos brasileiros entre pacientes com sepse severa não foi inferior a 45,8%, enquanto aqueles com choque séptico apresentaram uma mortalidade de 72,5% (23,1% e 54,1% em hospitais particulares, respectivamente). Em termos clínicos, o choque séptico associado à SDMO é a principal causa de morte em pacientes sépticos (DELLINGER et al., 2013).

1.3 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

De maneira sucinta, toxinas liberadas a partir de microorganismos patogênicos invasores (também conhecidas como padrões moleculares associados à patógenos – PAMPs) são responsáveis pelo desenvolvimento da sepse, pois apresentam capacidade de estimular o sistema imune inato de forma muito intensa (VAN DER POLL; OPAL, 2008). Endotoxinas (lipopolissacarídeos presentes na membrana celular de bactérias gram-negativas) representam as principais moléculas ou PAMPs desencadeadoras da síndrome séptica. Estas se ligam aos receptores CD14 e em especial ao receptor do tipo TLR-4 (*toll like*) de células mononucleares, determinando a ativação de cascatas proteolíticas intracelulares e a translocação do fator nuclear κ B (NF κ B) para o núcleo, o qual desencadeia a síntese e exocitose de citocinas inflamatórias (COHEN, 2002).

As interleucinas (IL-1 β e 6, dentre outras), os fatores estimuladores de colônia, os fatores promotores de necrose tumoral (TNF- α e β) e os interferons (α , β e γ) são as principais citocinas responsáveis pelas agressões tissulares, principalmente ao tecido endotelial (DINARELLO, 1997). Lesões teciduais oriundas do processo infeccioso e inflamatório também determinam a síntese e excreção das alarminas, as quais, juntamente às citocinas, representam os chamados padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs). Citocinas pró-inflamatórias e alarminas, desta forma, sinalizam ao organismo a ocorrência de uma infecção em curso desencadeando uma retroalimentação positiva e consequente amplificação da resposta inflamatória (fase de hiperinflamação da sepse) (NDUKA; PARRILLO, 2009).

Diversas outras substâncias, entretanto, também participam na patogênese da sepse favorecendo a perpetuação e generalização da resposta inflamatória e conseqüente alterações sistêmicas supracitadas (item 1.1). Dentre elas, o sistema de complemento (ex.: C5a), o fator ativador plaquetário, o fator tecidual, o óxido nítrico (sintetizado pelas isoformas endotelial, neuronal e induzida da enzima óxido nítrico sintase), as espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (radicais superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio e o peroxinitrito), assim como os eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) (Figura 2) (BRADY; POOLE-WILSON, 1993; FLIERL et al., 2007).

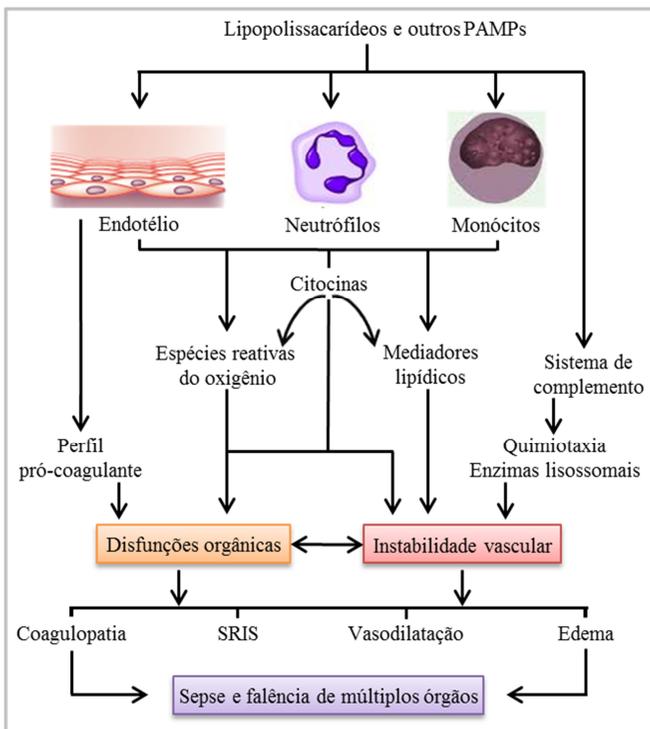


Figura 2: Representação esquemática da evolução patofisiológica da síndrome séptica. PAMPs: padrões

moleculares associados à patógenos; SRIS: síndrome de resposta inflamatória sistêmica. Modificado de Cohen, 2002.

No âmbito celular, a agressão ao aparato celular pelas moléculas inflamatórias associada à hipoxemia tecidual (devida à combinação da vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular, disfunção microcirculatória e reduzida capacidade contrátil miocárdica), desencadeiam uma incapacidade mitocondrial na utilização da molécula de oxigênio, estabelecendo o quadro de disóxia, edema mitocondrial e celular (MULLER-WERDAN et al., 2006). Adicionalmente, a ativação neutrofílica (amplificada pela ação da IL-8 e do leucotrieno B₄) determina a liberação de elastases, proteases, óxido nítrico e espécies reativas do oxigênio (ERO), com o intuito da opsonização e destruição do micro-organismo. Estas substâncias, porém, também contribuem para a degradação da matriz extracelular, agressão à membrana lipídica e ao DNA celular favorecendo as disfunções tissulares em caráter generalizado, dentre eles o tecido miocárdico (FLIERL et al., 2007; CASTOLDI et al., 2012).

1.4 MIOCARDIOPATIA SÉPTICA (MIS)

Inserida na miríade de alterações orgânicas induzidas pela inflamação sistêmica no paciente séptico, a disfunção miocárdica, ou recentemente denominada miocardiopatia séptica (MULLER-WERDAN et al., 2006), está entre as principais causas de óbitos de pacientes com sepse severa/choque séptico (KUMAR et al., 2011). Parrillo e colaboradores (1990) já haviam demonstrado na década de 90 o significativo índice de mortalidade de pacientes com MIS

(70% a 90%) quando comparado àqueles sem alterações cardíacas, cujo índice foi de aproximadamente 20%. Da mesma forma, Dellinger e colaboradores (2013) ressaltaram a ocorrência de índices de mortalidade não inferiores a 50% independente do tratamento otimizado para o choque séptico e MIS.

Contribuem para essa realidade a ausência de um completo entendimento acerca da fisiopatologia da MIS. Resultados de estudos clínicos e experimentais (em cultura de células ou em modelos de sepse em camundongos, ratos, ovelhas, coelhos e porcos) até o presente momento dividem o racional da disfunção miocárdica induzida pela sepse em duas grandes áreas de interesse: aquela onde se observa alterações funcionais das principais moléculas responsáveis pela cinética muscular cardíaca, e a que demonstra mudanças estruturais do aparato contrátil cardíaco, culminando em perda da função do coração (CELES; PRADO; ROSSI, 2013).

No que concerne as alterações funcionais cardíacas, as mesmas são baseadas no fato de que moléculas inflamatórias excitadas e/ou formadas sistemicamente e localmente, ou seja, no próprio tecido miocárdico (em especial TNF- α , IL-1 β , IL-6, óxido nítrico e o peroxinitrito) determinam modificações pré- e pós-traducionais de moléculas cardíacas (MERX; WEBER, 2007). A Figura 3 representa um compilado de literatura dos potenciais mecanismos celulares envolvidos nas alterações funcionais do tecido cardíaco durante a MIS.

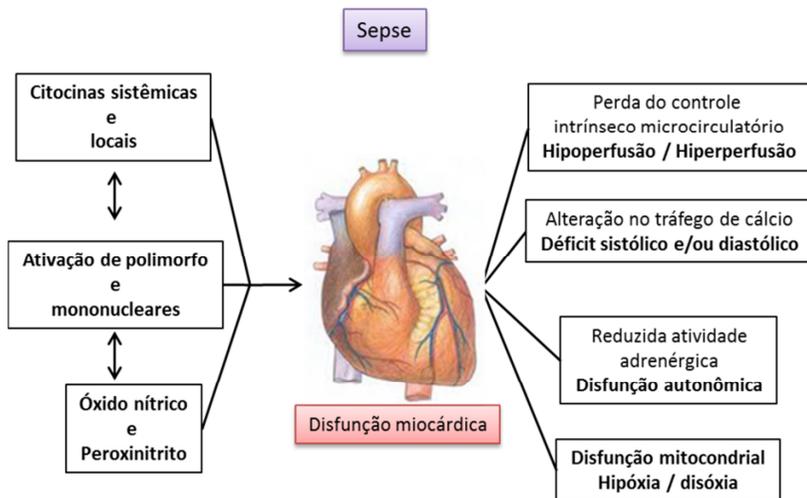


Figura 3: Resumo dos mecanismos e eventos envolvidos na disfunção miocárdica na sepse. A ativação de células mono e polimorfonucleares acrescida à intensa síntese e liberação de citocinas (representadas principalmente pela $TNF-\alpha$ e a $IL-1\beta$) e espécies reativas do oxigênio, favorecem a ausência de perfusão tecidual adequada pela microcirculação coronariana de acordo com a oferta (DO_2) e a demanda de oxigênio (VO_2), a baixa capacidade mitocondrial de utilização da molécula de oxigênio no ciclo do ácido cítrico para a geração de energia, mudanças na homeostase do cálcio intracelular no cardiomiócito, e a atividade reduzida da via transducional adrenérgica, todas consideradas importantes alterações presentes na MIS. Modificado de Merx & Weber (2007).

Ainda neste contexto, é sabido que o íon cálcio é o principal agente responsável pela cinética de contração e relaxamento do miocárdio e, desta forma, diversos trabalhos ao longo dos últimos anos procuraram demonstrar que as alterações das moléculas relacionadas com a cinética do tráfego deste cátion

nos cardiomiócitos são as principais causadoras da disfunção miocárdica durante a sepse (Figura 4) (ZHONG et al., 1997; MARX et al., 2000; WU et al., 2002; POTT; GOLDHABER, 2006; STENGL et al., 2010; KHO et al., 2011).

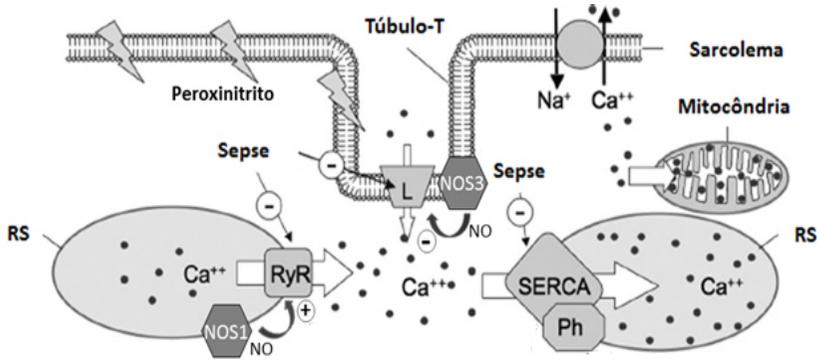


Figura 4: Principais estruturas envolvidas no tráfego de íon cálcio nos cardiomiócitos e prováveis sítios de modulação por moléculas produzidas durante a sepse. L: canal de cálcio voltagem-dependente do tipo L (lento), responsável pela entrada de cálcio extracelular mediante despolarização do potencial de membrana; NOS3: enzima óxido nítrico sintase 3 ou neuronal; RS: retículo sarcoplasmático, principal estoque intracelular de íon cálcio; RyR: receptor de rianodina, responsável pela liberação de íons cálcio do RS para o citoplasma a partir de estímulo por cálcio; NOS1: enzima óxido nítrico sintase 1 ou endotelial; SERCA: transportador de cálcio do RS dependente de ATPase, responsável pela recaptção do cálcio liberado pelo RyR; Ph: fosfolambana, proteína reguladora negativa da atividade da SERCA. Modificado de Rudiger & Singer (2007).

Dong e colaboradores (2001), por exemplo, sugerem a redução na densidade dos receptores de rianodina como responsável pelo déficit contrátil durante a sepse. Pesquisas recentes também demonstram a presença da disfunção contrátil em cardiomiócitos sem alterações na expressão proteica de canais de cálcio, mas decorrente de modificações pós-traducionais dos mesmos pela adição de radicais como por exemplo do ácido sulfônico (sulfonilação) ou da pequena molécula relacionada à ubiquitina - SUMO (sumoilação) (KHO et al., 2011; HOBAl et al., 2013). Ainda, segundo Wu e colaboradores (2002), a redução da fosforilação da proteína fosfolambana, sem que ocorra modificações de sua expressão, parece contribuir com a alteração do processo de recaptação do cálcio intracelular, determinando a disfunção diastólica na MIS. De acordo com Saraiva & Hare (2006), as isoformas da enzima óxido nítrico sintase 1 e 3 estão localizadas no sarcoplasma e retículo sarcoplasmático, respectivamente (conceito da localização da NOS em domínios subcelulares), modulando os canais de cálcio do tipo L e receptores rianodina (Figura 4). Os mesmos autores, sugerem, desta forma, que alterações na sinalização e funcionalidade dos respectivos canais de cálcio podem ocorrer devido a desbalanços no estado nitroso-redox nos respectivos domínios, comuns em situações patológicas.

Do ponto de vista das alterações estruturais como peças-chave para a disfunção cardíaca na MIS, Celes e colaboradores (2007 e 2010) sugeriram, com base no aumento da expressão da NOS2 e elevações do peroxinitrito em corações de camundongos sépticos, que o estresse oxidativo pode desempenhar papel importante no aumento da permeabilidade do sarcolema, rompimento dos filamentos de

actina e miosina e na deiscência dos discos intercalares dos cardiomiócitos, comprometendo o acoplamento eletroquímico e a funcionalidade cardíaca. Resultados similares foram encontrados em um estudo histológico e imunohistoquímico em corações humanos de pacientes com choque séptico e disfunção miocárdica, o qual também demonstrou aumento na expressão da enzima NOS2 e do peroxinitrito, além da nitrotirosina, estando esses achados associados à presença de ruptura dos filamentos actina e miosina (ROSSI et al., 2007).

Piper e colaboradores (1997) demonstraram haver alterações estruturais importantes no miocárdio tais como, necrose miocitária e edema mitocondrial durante a sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP) em ratos. Por outro lado, Zhou e colaboradores (1998) mostraram haver prejuízo na contratilidade miocárdica na ausência de lesão tecidual. Chopra & Sharma (2010) evidenciaram a ativação da enzima caspase-3 da cascata de apoptose em cardiomiócitos de ratos sépticos correlacionando-a com a clivagem de componentes do miofilamento, em especial a cadeia leve da miosina, e conseqüente diminuição do desempenho miocárdico.

De maneira interessante, Schmittinger e colaboradores (2013) observaram alterações patológicas em 90% a 100% dos 20 corações de pacientes humanos com choque séptico analisados histologicamente, tais como miocitólise, fibrose intersticial, necrose do aparato contrátil, infiltrados de células mononucleares e edema intersticial, que foram detectados em pelo menos 90% das amostras analisadas, assim como hemorragia tecidual em 30%. Desta forma, os autores concluem que lesões histológicas cardíacas são um achado *post-mortem* frequente de pacientes com choque séptico.

Quando análises estruturais são realizadas por meio de marcadores bioquímicos de lesão do tecido miocárdico, através da dosagem de troponina I (TnI) e creatina quinase MB (CK-MB), pesquisas também demonstram uma correlação positiva entre a ocorrência de choque séptico, o aumento destas na circulação e a ocorrência de maiores taxas de mortalidade em seres humanos (ARLATI et al., 2000; LODHA et al., 2009).

1.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA MIS

Didaticamente e historicamente, foram descritos dois estágios de alterações cardiovasculares durante a sepse. O primeiro estágio, conhecido como fase hiperdinâmica ou choque hiperdinâmico, é caracterizado pelo aumento do índice cardíaco, ou seja, elevação do débito cardíaco associado à baixa resistência vascular periférica e consequente manutenção do volume sistólico. O segundo estágio, denominado fase hipodinâmica, está associado ao choque hipodinâmico, e é caracterizado pela diminuição do desempenho cardíaco, com redução do débito cardíaco e hipotensão severa (FLYNN; CHOKKALINGAM MANI; MATHER, 2010).

Somente com o advento da monitoração invasiva (especialmente o cateter pulmonar) é que pôde-se observar que, independente da fase em que os pacientes sépticos se encontram (hiper ou hipodinâmica), é denominador comum a manifestação de uma disfunção cardíaca intrínseca denominada de depressão miocárdica, a qual ocorre na grande maioria dos pacientes com sepse. Esta é representada principalmente por uma baixa fração de ejeção, parâmetro quantitativo útil para a avaliação do desempenho contrátil ventricular, e amplamente utilizado na clínica (HUNTER; DODDI, 2010).

Além da redução na fração de ejeção ventricular, outros achados comuns da MIS são a manutenção e até aumento do débito cardíaco e dos volumes ventriculares (indicando congestão ventricular). Esta manutenção do débito cardíaco e a *priori* perfusão sistêmica adequada frente à reduzida capacidade contrátil miocárdica é creditada à presença concomitante de disfunção diastólica na MIS (HUNTER; DODDI, 2010). Seria, portanto, um possível mecanismo compensatório benéfico representado por aumentos no diâmetro da câmara ventricular sob repouso e no tempo de relaxamento das fibras musculares os quais aumentam a capacidade de enchimento das câmaras ventriculares (ROMERO-BERMEJO et al., 2011).

Estudos intra-hospitalares, entretanto, demonstram que as alterações diastólicas não devem ser negligenciadas, mas consideradas como igualmente responsáveis pelo impacto na taxa de mortalidade (POELAERT et al., 1997; LANDESBURG et al., 2012; MAHJOUR et al., 2012). Por fim, uma característica específica da MIS observada foi seu caráter de reversibilidade, normalmente em um intervalo de tempo entre sete à dez dias naqueles pacientes sobreviventes ao choque séptico (PARKER et al., 1984).

Definições recentes reconhecem a importância da depressão miocárdica na sepse, a qual é descrita em pelo menos 40% dos pacientes, e incluem esta evidência ecocardiográfica como um dos critérios para o diagnóstico da sepse severa (LEVY et al., 2003; RUDIGER; SINGER, 2007). Embora a ecocardiografia tenha um papel primordial na avaliação (não-invasiva) hospitalar da disfunção cardíaca na MIS, é sabido que esta técnica apresenta menor acurácia em detectar alterações cardiovasculares frente a métodos invasivos

como o cateter de artéria pulmonar ou do tipo pressão-volume (PACHER et al., 2008).

1.6 AVALIAÇÃO FUNCIONAL *IN SITU* DO SISTEMA CARDIOVASCULAR ATRAVÉS DO CATETER DE CONDUTÂNCIA PRESSÃO-VOLUME – UMA BREVE EXPLICAÇÃO

Desenvolvido a partir da segunda metade da década de 80 (Baan et al. 1984), o cateter de pressão e volume representa uma tecnologia única que a partir da emissão de um campo elétrico por microeletrodos (Figura 5), é capaz de avaliar *in vivo* e em tempo real a performance ventricular, de forma dependente e independente das condições volumétricas no interior da câmara cardíaca, aumentando assim sua especificidade de avaliação da função contrátil ventricular, bem como de quantificar o volume sanguíneo intraventricular.

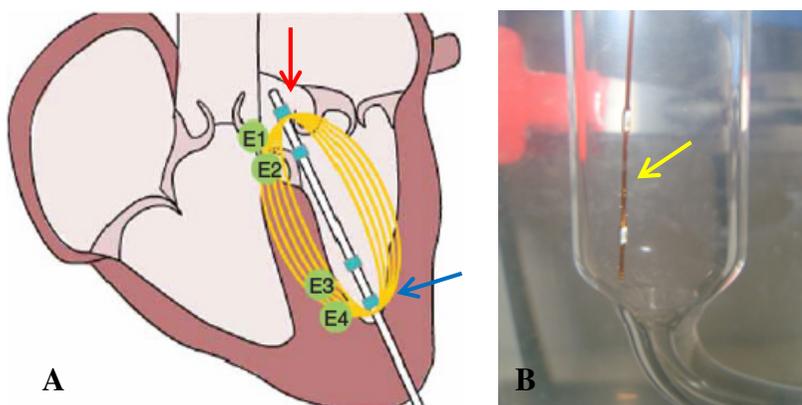


Figura 5: Figura representativa da emissão (eletrodo E4, seta azul) e captação (eletrodo E1, seta vermelha) de corrente

elétrica no interior do ventrículo esquerdo onde é possível observar a formação e condutividade do campo elétrico (em amarelo) através do sangue intraventricular, pelo músculo cardíaco e tecidos adjacentes (A) e cateter modelo SPR-901 (seta amarela) para ratos utilizados neste trabalho (B). Fontes: modificado de Pacher et al. 2008 (A); e o Autor (B).

As medidas obtidas baseiam-se no conceito de condutância e impedância, pois ao considerarmos a emissão de uma corrente elétrica de amplitude constante em uma determinada área (neste caso, a câmara ventricular), essa corrente ou campo elétrico certamente é influenciada pela forma ou formato da área (neste caso, a resistência pela câmara ventricular) ou pelas características físico-químicas do material que compõe essa área (neste caso, a resistividade pelo sangue, parede muscular e tecidos circunvizinhos) em que a corrente foi emitida. Essa teoria operacional pode ser simplificada pela Lei de Ohm, a qual demonstra que uma determinada diferença de potencial elétrico (V) é representada pela intensidade ou constante da corrente elétrica (I) e pela resistência ou impedância elétrica (R) do meio em que ela se encontra (ou seja, $V = IR$). Ocorre que a condutância (G) é inversamente proporcional à resistência elétrica (ou seja, $G = 1/R$), permitindo-se, portanto, considerar que, se $G = 1/R$ e $V = RI$, logo o valor da condutância pode ser representado pela razão da constante de corrente elétrica pelo potencial elétrico (ou seja, $G = I/V$). A partir deste entendimento, Baan e colaboradores (1984) desenvolveram a base para o cálculo do volume sanguíneo intraventricular a partir dos valores encontrados da condutância de um determinado campo elétrico

gerado no interior da câmara cardíaca; o respectivo cálculo, também denominado de Equação de Baan é representado por:

Volume = $\alpha^{-1}\rho L^2(G - G_p)$, onde:

- α = fator calibrador do volume
- ρ = resistividade do sangue
- L = comprimento entre os eletrodos do cateter
- G = condutância
- G_p = condutância paralela

Desta forma, enquanto os valores de α , ρ e L são fixos e informados ao sistema de leitura, o valor de G e consequentemente do volume de sangue intraventricular irá sofrer modificações em tempo real à medida que ocorre as variações do volume intraventricular na dinâmica cardíaca. A condutância paralela – G_p (ou volume paralelo), representa um fator negativo na equação de Baan de conversão de volume, pois decorre da condutância de tecidos circunvizinhos e não do sangue intraventricular. Por isso a G_p é determinada ao final da avaliação hemodinâmica, a partir da administração intravenosa de solução salina hipertônica, pois esta irá acarretar na mudança abrupta e temporária da condutância elétrica do *pool* sanguíneo do ventrículo esquerdo, porém sem que ocorra de fato alteração do volume sanguíneo ou da pressão intraventricular (STEENDIJK et al., 2001).

A Figura 6 exemplifica o momento da administração de salina hipertônica por via intravenosa, sendo possível observar que o parâmetro pressão intraventricular (seta preta) não sofre influência no momento da administração da salina, ao passo

que há aumento da condutância elétrica desencadeada pela salina e conseqüentemente do valor do volume intraventricular (seta vermelha). Porém, este aumento representa a condutividade paralela dos tecidos circunvizinhos e não um aumento do volume sanguíneo local.

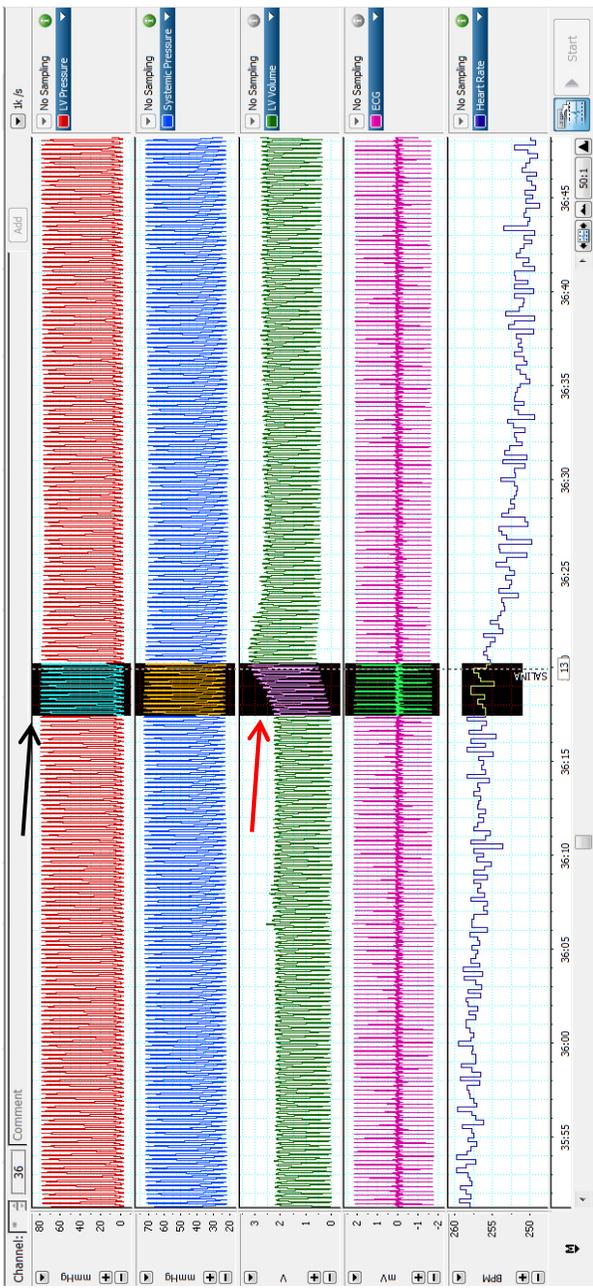


Figura 6: Registro típico de alteração da condutância elétrica do *pool* sanguíneo intraventricular após a administração intravenosa de solução salina hipertônica (30 μL a 30%) para o cálculo da condutância e volume paralelo indesejado dos tecidos cardíacos circunvizinhos à câmara ventricular (seta vermelha). Notar que a pressão intraventricular (seta preta) não foi influenciada pela administração da salina.

1.7 CONTEXTUALIZAÇÃO DESTE ESTUDO NO CENÁRIO ATUAL DA MIS

A despeito de uma série de alterações orgânicas, a falência circulatória, caracterizada pela hipotensão arterial (pressão arterial sistólica - Pas < 90 mmHg, pressão arterial média - Pam < 70 mmHg ou queda na Pas superior a 40 mmHg), está entre os principais fatores que levam à morte durante o choque séptico. Vasodilatação arterial e capacidade contrátil miocárdica reduzida são considerados os principais fatores determinantes para a ocorrência da hipotensão. Desta forma, drogas vasopressoras e/ou inotrópicas positivas, em especial a noradrenalina e a dobutamina, representam o tratamento de escolha para a falência circulatória decorrente do choque séptico. Porém, este tratamento persiste até o momento meramente como uma terapia de suporte (ZAUSIG et al., 2010).

Está bem documentada na literatura, entretanto, uma elevada prevalência de efeitos deletérios importantes ao próprio coração, isto é, cardiotoxicidade, pelo uso crônico destas catecolaminas (SAKR et al., 2006; CHOPRA; DAS; SHARMA, 2010). O uso crônico é justificado possivelmente em virtude da baixa expressão e/ou regulação dos receptores beta-adrenérgicos e sua via de transdução (proteína Gs – adenilil ciclase – AMPc – PKA) durante a sepse (BERNARDIN et al., 1998; MATSUDA et al., 2000). A atividade reduzida da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) após estimulação com catecolaminas determina diminuição da fosforilação dos canais de cálcio do tipo lento e conseqüente incapacidade de seu acoplamento com os receptores de rianodina para que ocorra a liberação maciça de

cálcio intracelular e resposta de excitação-contração miocárdica adequada (BERNARDIN et al., 2003; HUNTER; DODDI, 2010).

Desta forma, uma vez que não há consenso acerca da etiopatogenia da MIS, a última diretriz internacional para o tratamento do choque séptico (*Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock*) revela que, embora o uso de vasopressores e especialmente inotrópicos tenham elevada recomendação para o tratamento do choque séptico visando o aumento da pressão arterial, a clareza de evidência(s) científica(s) e benefícios para o seu emprego clínico persiste baixa (BOUFERRACHE et al., 2012; DELLINGER et al., 2013).

Outro importante aspecto a ser observado nas diretrizes do tratamento preconizado para a MIS é que, a despeito das já bem descritas diferenças entre homens e mulheres na fisiopatologia das miocardiopatias (dilatada e hipertrófica) encontradas na literatura, suficientes para o estabelecimento de consensos de prevenção e tratamento independentes (MOSCA, 2008; MOSCA et al., 2011), o tratamento da MIS com catecolaminas permanece o mesmo entre os gêneros (DELLINGER et al., 2013). Estudos observacionais intra-hospitalares acerca das alterações cardiovasculares, bem como do índice de mortalidade entre homens e mulheres com sepse, não demonstraram diferenças significativas, sendo estes usados como referência até o presente momento para ausência de um tratamento direcionado para homens ou mulheres (ANGUS et al., 2001). Estudos laboratoriais e também intra-hospitalares mais recentes, entretanto, começam a refutar esta ideia, pois observam claras diferenças entre os gêneros na sepse/MIS

(SCHRÖDER et al., 1998; HUBACEK et al., 2001; VINCENT et al., 2006).

A ausência de uma compreensão mais ampla sobre a fisiopatologia da MIS certamente é fator determinante para o não direcionamento do tratamento da MIS de acordo com o gênero. Adicionalmente, observa-se que no cenário da pesquisa com animais de laboratório para o estudo da sepse e MIS, a parcela de pesquisas em fêmeas é reduzida, sendo a grande maioria destas realizadas com machos (tanto ratos como camundongos) (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

Ainda que os animais utilizados sejam primordialmente machos, a evolução da disfunção cardíaca de ratos submetidos a diferentes modelos experimentais de sepse também persiste incerta, assim como a sua correlação com prováveis alterações moleculares cardíacas e de resposta às principais catecolaminas utilizadas para o tratamento do choque séptico. Apesar da descrição encontrada na literatura científica acerca da disfunção cardíaca durante o choque séptico, avaliações experimentais ou mesmo o tratamento clínico desta condição normalmente são baseados no parâmetro hemodinâmico da pressão arterial e discretamente por variáveis cardíacas como o débito cardíaco, a fração de ejeção ou parâmetros diastólicos (DELLINGER et al., 2008; HUNTER; DODDI, 2010). Justifica-se, desta forma, a necessidade de abordagens experimentais que investiguem a evolução fisiopatológica da MIS em diferentes modelos de sepse através de avaliação cardíaca dinâmica *in vivo* e de expressão de proteínas responsáveis pela cinética da contração e do relaxamento muscular cardíaco.

Sendo assim, hipotetizamos que ratos machos e fêmeas submetidos à sepse apresentam disfunção miocárdica com

diferentes perfis de evolução. Ainda, que diferentes modelos de sepse determinam respostas cardiovasculares diferenciadas e que alterações de proteínas responsáveis pela cinética do íon cálcio contribuem com as disfunções cardíacas observadas. Desta forma, investigamos o decurso temporal das alterações cardíacas, a sua importância para a evolução dos animais, bem como a influência do gênero e modelo de indução de sepse utilizados. Adicionalmente, avaliamos por meio de medida *in situ* das capacidades contrátil, de relaxamento ventricular, e da dinâmica do volume intraventricular, os efeitos dos principais fármacos com ação vasopressora, crono e inotrópica positiva utilizados na rotina clínica para o tratamento do paciente séptico.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar a ocorrência da disfunção cardíaca em ratos machos e/ou fêmeas submetidos a diferentes modelos de sepse, isto é, de choque endotóxico (administração de lipopolissacarídeo-LPS) e/ou choque séptico (cirurgia de ligadura e perfuração cecal-CLP); determinar o perfil cardiodinâmico presente de acordo com o modelo utilizado e a sua resposta frente a administração de diferentes fármacos com ação cardiovascular os quais são frequentemente empregados para o tratamento clínico de pacientes humanos com choque séptico.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar a ocorrência de sepse nos animais submetidos aos modelos de administração de lipopolissacarídeo por via intraperitoneal (LPS) ou de cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) por meio de exames laboratoriais específicos;
- b) Avaliar em ratos machos e fêmeas a função cardiovascular *in situ* em diferentes tempos experimentais após a administração de lipopolissacarídeo por via intraperitoneal (LPS) ou cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP);
- c) Determinar através da avaliação cardíaca *in situ* os tempos em que se instalam as alterações cardiovasculares compatíveis com choque induzido pela sepse em ratos machos e/ou fêmeas submetidos aos modelos de choque endotóxico (LPS) ou séptico (CLP);

- d) Determinar se as alterações cardíacas induzidas pela sepse apresentam evolução fisiopatológica e perfil cardiodinâmico discrepantes de acordo com o gênero dos animais;
- e) Avaliar a influência de drogas com ações vasopressoras, inotrópicas e cronotrópicas (exemplo: fenilefrina, noradrenalina e dobutamina) sobre a funcionalidade cardíaca em experimentos *in situ* de ratos machos e/ou fêmeas submetidos ao choque endotóxico ou séptico pelas técnicas de LPS e CLP, respectivamente;
- f) Observar se há diferenças no perfil da resposta cardiovascular frente a administração de drogas com ação no sistema cardiovascular de acordo com os diferentes modelos de sepse utilizados (LPS ou CLP);
- g) Determinar pela técnica de imunoeletoforese, a expressão de componentes importantes para a utilização e mobilização de cálcio (incluindo receptores de rianodina, proteína transportadora de cálcio do retículo sarcoplasmático dependente de ATPase, e proteína fosfolambana) no coração de ratos machos e fêmeas submetidos ao choque endotóxico (LPS) ou séptico (CLP);
- h) Observar se há diferenças na expressão de componentes importantes para a utilização e mobilização de cálcio de acordo com o gênero ou com os modelos de sepse utilizados (LPS ou CLP).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas com 14 a 16 semanas de idade, pesando entre 280-330 g e 190-240 g, respectivamente. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da mesma universidade em ambiente com temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro a cada 12/12 horas) controladas automaticamente. Água e ração foram fornecidos à vontade, havendo um período de aclimação de pelo menos sete dias em biotério setorial antes que os experimentos fossem realizados. Todos os protocolos realizados foram previamente avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) sob o número de Protocolo PP00566 e estão 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).

3.2 DROGAS E REAGENTES

Soluções e sais: 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); salina tris-tamponada com *tween* 20 (TBS-T, composição em mM: 137 de NaCl 137, 2,7 de KCl, 1,5 de KH_2PO_4 , 20 de Na_2HPO_4 , acrescido de *tween*-20 0,05%).

Drogas anestésicas e/ou sedativas e para analgesia: isoflurano 100%, solução inalante (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil); cloridrato de xilazina 2% (VetBrands, Jacareí, São Paulo, Brasil); cloridrato de cetamina 10% (Syntec, Cotia, São Paulo, Brasil); cloridrato de lidocaína (2%, sem vasoconstritor); e cloridrato de tramadol 5% (ambos Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil).

Outras drogas e compostos: heparina sódica 5000 UI/ml (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil); fenilefrina, dobutamina e noradrenalina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, sorotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA).

Anticorpos e reagentes para imunoelektroforese: anticorpos primários para rianodina, RhoA, ROCK I, ROCK II, IP3R, SERCA, fosfolambana, fosfo-fosfolambana (todos comprados da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e GAPDH (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); anticorpos secundários (comprados da Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); reagente de detecção ECL plus ou normal (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

3.3 AVALIAÇÃO DA DIURESE, DO pH URINÁRIO E DA INGESTÃO HÍDRICA

Para a análise da diurese, os animais foram alocados individualmente em gaiolas metabólicas com livre acesso à água e ração. Foram mensuradas as produções urinárias nos tempos de 0, 1, 2, 4, 6, 19, 20, 22 e 24 horas após a alocação dos animais nas gaiolas. Ao final da 6^a e 24^a hora também foram avaliadas a ingestão hídrica dos animais, assim como o pH e a densidade da urina coletada.

3.4 PROTOCOLOS ANESTÉSICOS

Para os experimentos de cateterismo do ventrículo esquerdo, os animais foram sedados através da administração de 2 mg/kg de xilazina (i.p) e, após cinco minutos, acomodados em câmara anestésica com mistura de isoflurano (3%) e oxigênio (100%) para indução anestésica por via inalatória. O plano anestésico foi mantido por meio de máscara facial com inalação contínua da mistura de isoflurano (1%) e oxigênio (100%) via respiração espontânea. O anestésico local lidocaína (2%, sem vasoconstritor) foi infiltrado nos sítios cirúrgicos (pele, tecido celular subcutâneo da região ventral do pescoço; músculos esterno-hióideo, omo-hióideo e esternomastóideo) no volume final de 100 µL para cada sítio de infiltração para posterior incisão, divulsão dos tecidos e localização/isolamento da artéria carótida direita.

Para a realização da cirurgia de ligadura e perfuração cecal (modelo de CLP), os animais foram primeiramente sedados e analgesiados por meio de aplicação de xilazina e tramadol nas dosagens de 5 e 10 mg/kg (i.p), respectivamente. Após 5 minutos, os animais foram anestesiados em câmara anestésica saturada com mistura de isoflurano (aproximadamente 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 de pinçamento das patas e cauda, os animais receberam infiltrações subcutânea e na linha alba (locais da incisão cirúrgica) do anestésico local lidocaína (2%, sem vasoconstritor) no volume final de 200 µL para cada sítio de infiltração.

Para a coleta do coração e do pulmão para as análises de imunoeletroforese e do peso úmido/peso seco, respectivamente, os animais foram anestesiados com uma dose única dos anestésicos gerais cetamina e xilazina nas dosagens de 100 e 20 mg/kg, i.p, respectivamente. Somente após a confirmação do plano anestésico profundo, ou seja, observação da ausência de reflexos e reações a estímulos externos de pinçamento das patas e cauda, é que o procedimento de coleta teve início.

3.5 ANÁLISE *IN SITU* 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 3.4. A temperatura corporal dos animais foi monitorada (via termômetro retal) e controlada durante todo o procedimento, sendo sempre mantida no intervalo de 36,9°C e 37,7°C por meio de uma placa aquecida a base de água. Após confirmação de ausência de respostas à estímulos externos de pinçamentos dos membros pélvicos e da cauda, realizou-se punção da veia caudal lateral para a inserção de um cateter intravascular de tamanho 24G para a administração de 10 UI de heparina com intuito de prevenir a formação de coágulos durante o procedimento de cateterismo. A veia jugular externa esquerda e a artéria carótida direita, a qual foi dissecada e isolada do nervo vago, foram então expostas; 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 7).

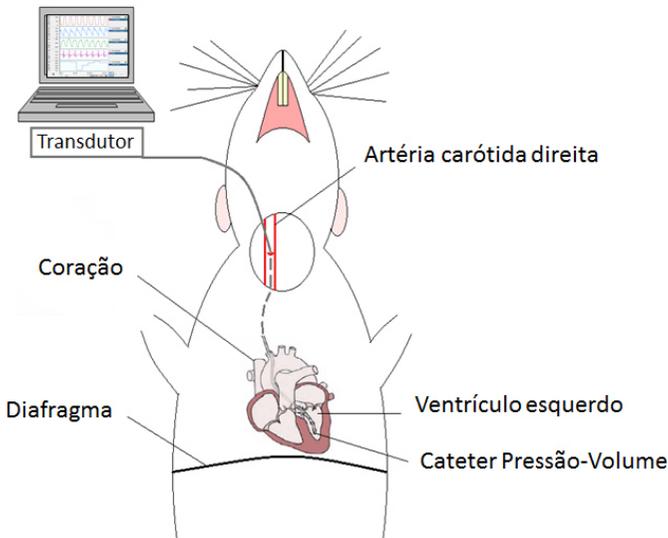


Figura 7: Esquema representativo do procedimento de cateterismo do ventrículo esquerdo a partir da artéria carótida direita por meio do cateter de pressão-volume (SPR-901, Millar Instruments Inc., Houston, TX, EUA). Fonte: Autor.

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 Hall, Austrália), os quais forneceram as avaliações hemodinâmicas em tempo real. 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 (Figura 8).

Além das avaliações em tempo real da pressão e volume intraventricular, pressão arterial sistêmica,

eletrocardiografia e frequência cardíaca, também foram avaliados (*offline*), o débito cardíaco e o volume diastólico final, assim como os parâmetros de funcionalidade contrátil do ventrículo esquerdo que são dependentes do volume ventricular (fração de ejeção, derivada positiva da pressão intraventricular sobre o tempo [dP/dt_{max}], pressão intraventricular em momento de dP/dt_{max} [$P@dP/dt_{max}$], e trabalho sistólico) e independentes do volume ventricular (trabalho sistólico recrutado pela pré-carga [PRSW], relação dP/dt_{max} com o volume diastólico final [$dP/dt_{max} - EDV$] e relação pressão-volume ao final da sístole [ESPVR]). Parâmetros diastólicos também foram analisados, incluindo, derivada negativa da pressão intraventricular sobre o tempo – dP/dt_{min} e Tempo de relaxamento isovolumétrico – *Tau* (obtida pelo método de Glantz). Todas essas derivadas foram calculadas utilizando-se um intervalo de 5 segundos dos dados de pressão e volume intraventricular obtidos.

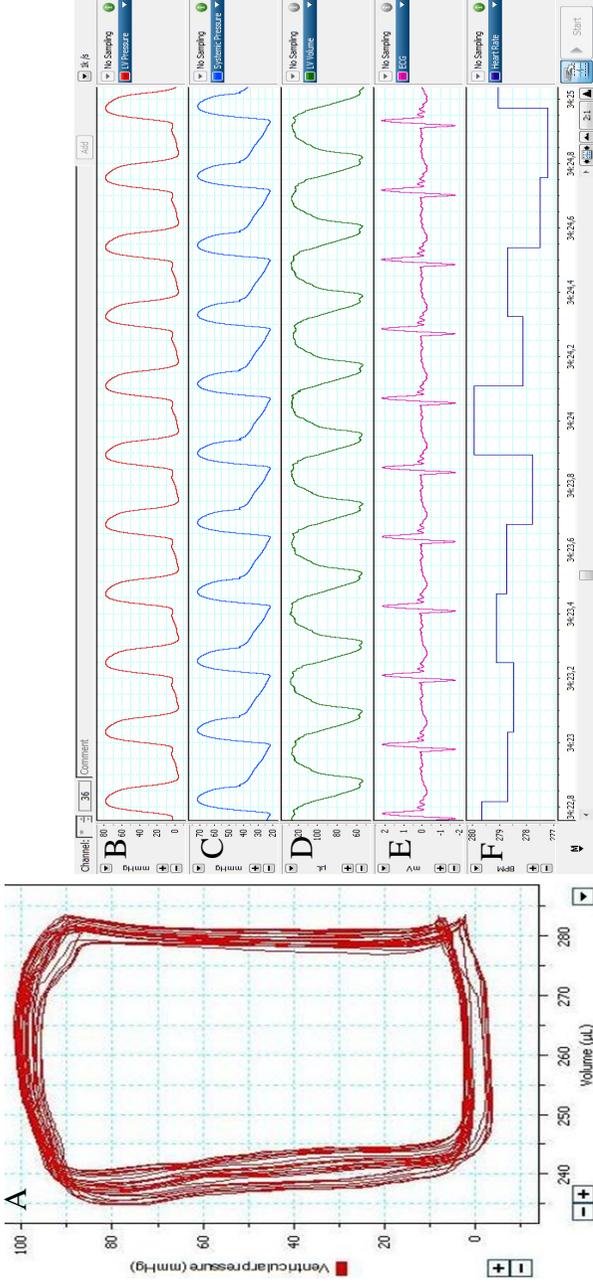


Figura 8: Exemplo de registros típicos de curvas padrão da dinâmica pressão e volume intraventricular (A) e de pressão intraventricular (B), pressão arterial sistêmica (C), volume intraventricular (D), eletrocardiografia (E) e frequência cardíaca (F) obtidas em nossos experimentos por meio do cateter de pressão-volume (SPR-901, Millar Instruments Inc., Houston, TX, EUA). Fonte: Autor.

O volume e a pressão foram calibrados pelos métodos da cubeta (através de áreas e volumes conhecidos) e pela interface do sistema (MPVS-Ultra[®], v.2.0; Millar Instruments, Houston, TX, EUA), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. Ao final dos experimentos uma administração de 30 μ L de salina hipertônica (30%) foi realizada pela veia jugular externa direita com o intuito de se determinar o valor da condutância paralela, a qual representa a condutividade elétrica não desejada da parede muscular do ventrículo esquerdo e tecidos circunvizinhos (vide item 1.6).

Finalmente, uma laparotomia foi realizada imediatamente abaixo do processo xifóide para localização e compressão cuidadosa da veia cava caudal com um cotonete durante aproximadamente três segundos, para a análise de parâmetros ventriculares independentes de volume. Terminado os experimentos, os animais foram eutanasiados por exposição a concentrações elevadas do anestésico inalatório isoflurano.

3.6 COLETA DE SANGUE PARA ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

A obtenção de sangue para dosagem da glicemia foi realizada por meio de punção na ponta da cauda com uma agulha 22G e conseqüente exposição de uma gota de sangue para mensuração em aparelho medidor de glicose (Accu-Chek Active[®], Roche, Mannheim, Alemanha). Todas as medições da glicemia foram realizadas em momento anterior aos experimentos de cateterismo do ventrículo esquerdo e sem a aplicação de qualquer droga anestésica ou sedativa. Após os animais serem anestesiados, 1 mL de sangue arterial foi coletado (volume que representa menos de 7% da volemia dos

animais estudados) por meio da artéria carótida direita, o qual foi acondicionado em tubo tipo eppendorf contendo 40 μL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para posterior análise hematológica em contador hematológico automatizado (HORIBA ABX[®], Micros 60; Montpellier, França). Foram avaliados o hematócrito, o número de leucócitos totais, de linfócitos, monócitos, granulócitos e plaquetas.

3.7 DOSAGEM DE NITRITO E NITRATO (NO_x)

A dosagem de NO_x foi realizada por meio do método de Griess como previamente descrito (GRANGER et al., 1990) a partir do plasma obtido de sangue (1 mL) centrifugado a 4.000 rpm durante 10 minutos. Resumidamente, 200 μL de amostra foram diluídas e desproteinizadas em sulfato de zinco na proporção de 1:10, incubadas por 1 hora a 4°C e centrifugadas em seguida a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Concentrações crescentes de nitrito e nitrato (0 a 150 μM) e 200 μL das amostras (em duplicata) foram acondicionadas em placas de 96 poços para a conversão de nitrato a nitrito, a partir de incubação por 3 horas à 37°C com bactérias *Escherichia coli* expressando a enzima nitrato redutase. Uma nova centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos foi realizada seguida pela transferência de 100 μL do sobrenadante para outra placa de 96 poços; 100 μL do reagente de Griess foi adicionado à placa e, passados 10 minutos, realizou-se a leitura em comprimento de onda de 543 nm (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça).

3.8 IMUNOELETROFORESE

3.8.1 Coração

A análise da expressão de proteínas de interesse foi realizada em amostras do ventrículo esquerdo de animais anestesiados conforme descrito no item 3.4. Para a coleta do tecido, uma esternectomia total foi realizada seguida pela visualização e punção do ventrículo esquerdo do animal com um cateter periférico tipo *scalp* acoplado a um sistema de perfusão. Adicionalmente uma secção do átrio direito foi realizada para o escoamento do sangue. Os corações foram então perfundidos com aproximadamente 150 mL de solução salina 0,9%, a uma temperatura de 4°C, por um período em torno de 5 minutos. Após perfusão cardíaca, os corações foram retirados e acondicionados em tubos tipo eppendorf e imergidos em nitrogênio líquido para posterior armazenamento em freezer (-80°C).

3.8.2 Preparo das amostras e dosagem de proteínas

Aproximadamente 200 mg do ventrículo esquerdo foi pulverizado e acondicionado em tubo tipo eppendorf contendo tampão de lise. As amostras foram homogeneizadas por sonicação durante 5 segundos a uma potência de 60 Watts e incubadas em gelo por 1 hora; em seguida os tubos foram centrifugados a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Uma alíquota do sobrenadante (6 µL) de cada amostra foi adicionada em novo tubo contendo 24 µL de tampão de lise para a dosagem de proteína através do método de Smith ou BCA (Smith et al., 1985). Uma curva padrão para referência foi

preparada em placa de 96 poços utilizando-se albumina sérica bovina (BSA). Em cada poço foram acrescentadas as amostras mais 100 μ L de BCA (ácido bicinchoninico 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina) com posterior incubação por 1 hora a 37°C. A leitura foi realizada em um leitor de placas a 570 nm (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). O sobrenadante restante das amostras foi transferido para novos tubos tipo eppendorf e acrescido de tampão de Laemmli em igual proporção (1:1), sendo os mesmos incubados a 95°C por 10 minutos. Por fim, as amostras foram estocadas em freezer (-80°C) até a realização da imunoeletroforese.

3.8.3 Eletroforese e imunodeteção

As proteínas foram separadas por eletroforese, sendo utilizado um gel de separação e um gel de entrada. Os padrões de interesse foram aplicados nos géis (Precision Plus Protein™, BioRad, CA, EUA ou HiMark, Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), seguido por 40 μ g de amostra por poço. A fase seguinte, de separação de proteínas, foi realizada a 90 V, por aproximadamente 3 horas. Posteriormente, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, CA, EUA) durante 1 hora, a 100 V e sob temperatura de 4°C.

As membranas foram coradas com vermelho de Ponceau para a visualização das bandas e depois lavadas durante 30 minutos com TBS-T para retirada do corante. Após lavagem, as membranas foram incubadas com TBS-T acrescido de leite desnatado 5% por 1 hora em temperatura ambiente para o bloqueio das mesmas. Em seguida, foram incubadas por aproximadamente 15 horas (*overnight*) a 4 °C com os

anticorpos primários para rianodina, RhoA, ROCK I, ROCK II, IP3R (todos 1:500), SERCA (1:1000), fosfolambana, fosfofosfolambana (ambos 1:2000) e GAPDH (1:15000). Terminado o período de incubação, as membranas foram lavadas por 30 minutos com TBS-T sob agitação e, em seguida, incubadas com os anticorpos secundários (1:5000) por um período de 1 hora em temperatura ambiente. Uma nova lavagem de 30 minutos com TBS-T foi então realizada seguida pela exposição das membranas durante 1 minuto ao kit de quimiluminescência e revelação através de um fotodocumentador (ChemiDoc, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa Image Lab (versão 4.1; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.9.1 PARTE 1: Comparação da funcionalidade cardíaca por análise *in situ* em ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo de choque endotóxico

3.9.1.1 Indução do choque endotóxico e escolha dos grupos experimentais

A indução de choque endotóxico foi realizada pela administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril na dose de 10 mg/kg. Os animais foram avaliados 6 e 24 horas após a administração do LPS (baseado em estudos preliminares do laboratório), sendo descritos como grupos LPS 6 e LPS 24 horas, respectivamente. Animais do

grupo Controle receberam o mesmo volume (1 mL/kg) de solução de PBS estéril e foram avaliados nos mesmos tempos de 6 e 24 horas após a aplicação.

3.9.1.2 Avaliação hemodinâmica e da função cardíaca *in situ*

Após a inserção do cateter de pressão-volume no ventrículo esquerdo, conforme descrito no item 3.5, um período de 20 minutos foi permitido para a estabilização dos animais (mantidos sob anestesia inalatória), seguido pela avaliação dos parâmetros hemodinâmicos basais por um período de 5 minutos, sem qualquer interferência mecânica ou farmacológica. Posteriormente, doses crescentes de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg) foram administradas por via intravenosa nos diferentes grupos experimentais (Controle, LPS 6 e 24 h). Após a administração da primeira dose de cada fármaco, as doses subsequentes eram injetadas somente quando havia o retorno dos parâmetros hemodinâmicos para os seus valores basais.

3.9.1.3 Avaliações da diurese, pH urinário, ingesta hídrica, hematológica e dosagens de NO_x

Os animais do grupo Controle, LPS 6 h e LPS 24 h foram submetidos as avaliações da diurese, pH urinário, ingesta hídrica, hematológica e dosagens de NO_x de acordo com os protocolos expostos nos itens 3.3, 3.6 e 3.7, respectivamente.

3.9.2 PARTE 2: Avaliação da funcionalidade cardíaca por análise *in situ* de ratos machos submetidos ao choque séptico

3.9.2.1 Indução do choque séptico

Para a indução do choque séptico os animais foram inicialmente anestesiados conforme descrito no item 3.4. Confirmada a anestesia e analgesia satisfatória, os animais foram submetidos ao modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP), descrito inicialmente por Wichterman e colaboradores (1980). Uma laparotomia por meio de uma incisão mediana retro-umbilical de aproximadamente 1 centímetro foi realizada para a localização e exposição completa do ceco. Imediatamente abaixo da válvula ileocecal, realizou-se a ligadura cecal do tipo não-obstrutiva (50% do ceco) com fio cirúrgico de seda tamanho 3-0, seguida por quatro perfurações não-transfixantes utilizando uma agulha de tamanho 18G. Realizada a ligadura e as perfurações, o ceco foi levemente pressionado para assegurar a saída do conteúdo fecal em cada orifício (formação de botões fecais), e posteriormente recolocado na cavidade abdominal, seguido pela rafia da linha alba, tecido celular subcutâneo e pele. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, reposições volêmicas foram realizadas por meio da administração de solução de PBS aquecida (~37°C) na dosagem de 30 mL/kg por via subcutânea (s.c.), com aplicações posteriores a cada 12 horas em um total de três aplicações. Cloridrato de tramadol (5 mg/kg, s.c.) foi aplicado em intervalos de 12 horas durante as primeiras 48 horas após o procedimento cirúrgico. Todos os animais foram mantidos em ambiente aquecido (colchão térmico) durante a cirurgia e até a

completa recuperação da anestesia (três horas após o procedimento cirúrgico). Somente os animais com completa recuperação da anestesia, foram utilizados nos experimentos propostos. A curva de sobrevivência dos animais foi avaliada em intervalos de 12 horas por um período um total de 120 horas de análise após a cirurgia. Os animais falso-operados ou grupo Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, porém não sofreram a ligadura e perfuração do ceco, sendo apenas realizada a laparotomia e rafia abdominal. Os animais controle (naive) não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico ou tratamento hídrico e farmacológico.

3.9.2.2 Avaliação da mortalidade e escolha dos grupos experimentais

A observação da mortalidade dos animais foi realizada com intervalos de 12 horas no decorrer de 120 horas corridas. De acordo com a curva de mortalidade padronizada obtida (vide no item 4.2.1, Resultados), 24 e 48 horas após o procedimento cirúrgico foram os tempos escolhidos para as análises do estudo proposto. Para tanto, os grupos experimentais foram denominados de Controle, CLP 24 e 48 h. Animais do grupo Sham e Controle não apresentaram diferença de mortalidade entre eles, sendo desta forma escolhido apenas o grupo Controle para os experimentos posteriores.

3.9.2.3 Avaliação hemodinâmica e da função cardíaca *in situ*

Após a inserção do cateter de pressão-volume no ventrículo esquerdo, conforme descrito no item 3.5, um período de 20 minutos foi permitido para a estabilização dos

animais (mantidos sob anestesia inalatória), seguido pela avaliação dos parâmetros hemodinâmicos basais por um período de 5 minutos, sem qualquer interferência mecânica ou farmacológica. Posteriormente, doses crescentes de noradrenalina (1, 3 e 10 nmol/kg) e dobutamina (3, 10 e 30 nmol/kg) foram administradas por via intravenosa nos diferentes grupos experimentais (Controle, CLP 24 e 48 h). Após a administração da primeira dose de cada fármaco, as doses subsequentes eram injetadas somente quando havia o retorno dos parâmetros hemodinâmicos para os seus valores basais. Quando mais de um fármaco era administrado no mesmo animal, um intervalo de quinze minutos sem a administração de qualquer outro fármaco foi respeitado (período determinado em experimentos preliminares), permitindo o retorno dos parâmetros hemodinâmicos aos valores basais.

3.9.2.4 Avaliação hematológica

Os animais do grupo Controle, CLP 24 h e CLP 48 h foram submetidos a avaliação hematológica de acordo com os protocolos expostos nos itens 3.6 e 3.7.

3.9.3 PARTE 3: Comparação do perfil cardiodinâmico e de expressão das principais proteínas cardíacas responsáveis pelo tráfego do íon cálcio em ratos machos submetidos aos choque endotóxico ou séptico

3.9.3.1 Indução do choque endotóxico ou séptico e grupos experimentais

Para a indução do choque endotóxico (aplicação de LPS) e séptico (via CLP), os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos conforme descritos anteriormente nos itens 3.9.1.1 e 3.9.2.1, respectivamente. Os grupos experimentais de interesse foram aqueles que receberam administração de LPS 6 e 24 horas antes (LPS 6 e 24 h) ou foram submetidos à cirurgia de CLP 24 e 48 horas antes (CLP 24 e 48 h). O grupo controle do modelo de choque endotóxico recebeu salina estéril (1 mL/kg, i.p), enquanto o grupo controle do modelo de choque séptico foi representado por animais naive.

3.9.3.2 Avaliação hemodinâmica e da função cardíaca *in situ*

Após a inserção do cateter de pressão-volume no ventrículo esquerdo, conforme descrito no item 3.5, um período de 20 minutos foi permitido para a estabilização dos animais (mantidos sob anestesia inalatória), seguido pela avaliação dos parâmetros hemodinâmicos basais por um período de 5 minutos, sem qualquer interferência mecânica ou farmacológica. Posteriormente uma dose de 30 nmol/kg de dobutamina foi administrada por via intravenosa nos diferentes

grupos experimentais (controle, LPS 6 h, LPS 24 h, CLP 24 h e CLP 48 h).

3.9.3.3 Expressão de proteínas cardíacas responsáveis pelo tráfego de íon cálcio

Os protocolos experimentais seguidos para extração do tecido cardíaco dos grupos controle, LPS 6 h e CLP 48 h, e realização da imunoeletroforese foram descritos nos itens 3.4 e 3.8. As proteínas de interesse avaliadas foram: rianodina, RhoA, ROCK I, ROCK II, IP3R, SERCA, e GAPDH.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As curvas de mortalidade foram analisadas pelo teste de log-rank (Mantel-Cox). As diferenças entre as curvas representativas de cada grupo experimental foram consideradas significativamente diferentes quando $P < 0,05$.

Os demais resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Após verificar a normalidade, os diferentes resultados de interesse dos grupos experimentais foram submetidos ao teste *t* de *Student* (quando apropriado) ou à análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas (uma ou duas vias). Quando a ANOVA revelou uma interação significativa entre as variáveis independentes, os testes *post-hoc* de Newman-Keuls ou Bonferroni foram utilizados quando apropriados, sendo os dados considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através dos programas Statistica[®] (versão 7.0, StatSoft Inc, Tulsa, OK, EUA) e GraphPad Prism[®] (versão 5.04, La jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 PARTE 1: COMPARAÇÃO DA FUNCIONALIDADE CARDÍACA POR ANÁLISE *IN SITU* DE RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO MODELO DE CHOQUE ENDOTÓXICO

4.1.1 Alterações de temperatura e laboratoriais de ratos machos e fêmeas com endotoxemia

Os ratos machos e fêmeas do grupo LPS 6 h quando comparados ao grupo controle apresentaram redução da temperatura corporal, o que se normalizou em ambos os gêneros 24 horas após a aplicação do LPS (grupos LPS 24 h) (Tabela 1). Não houve diferenças significativas das temperaturas corporais na comparação inter-gênero.

Tabela 1: Temperatura corporal de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.

	Machos			Fêmeas		
	Controle	LPS 6 h	LPS 24 h	Controle	LPS 6 h	LPS 24 h
Temperatura (°C)	37,3 ± 0,1	36,6 ± 0,1 [*]	37,7 ± 0,3 [#]	37,7 ± 0,2	36,5 ± 0,3 [*]	37,5 ± 0,1 [#]

Os resultados representam média ± EPM de 5 a 8 animais por grupo. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e LPS 6 h, respectivamente.

Uma redução significativa da diurese foi observada nos ratos machos nos tempos 4 e 6 horas após a administração de LPS, ao passo que as fêmeas tiveram redução da produção urinária somente 4 horas após (Figura 9, A e C, respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas da diurese em ambos os gêneros após a 6^a hora de análise (Figura 9, B e D).

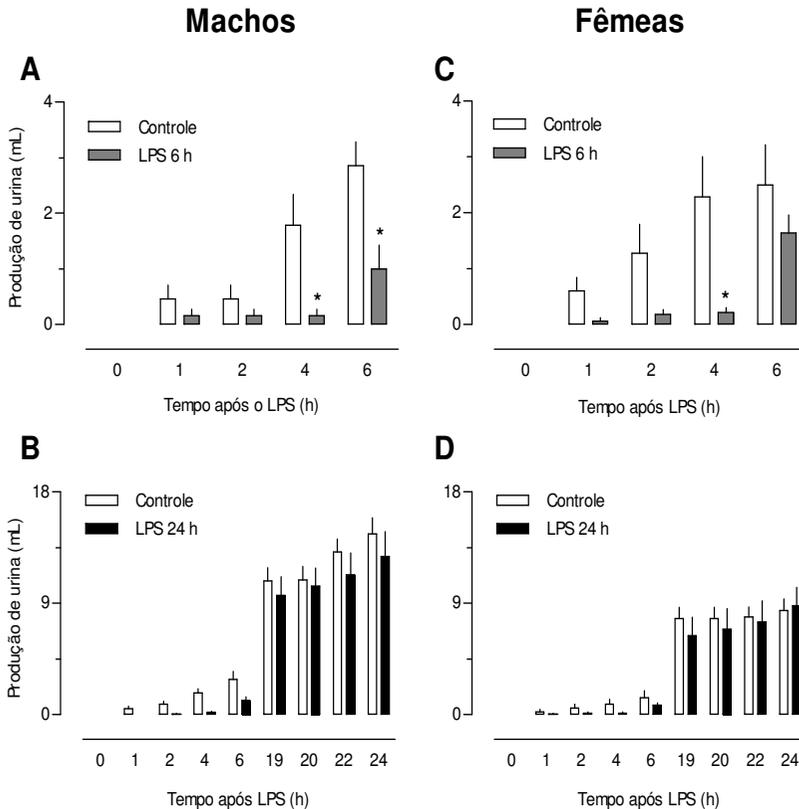


Figura 9: Diurese de ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados representam média \pm EPM de 7 a

8 animais por grupo. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle.

A avaliação da ingestão hídrica revelou redução no consumo de água, a qual foi observada nos grupos LPS 24 h, mas não nos grupos LPS 6 h, tanto nos ratos machos quanto nas fêmeas (Figura 10).

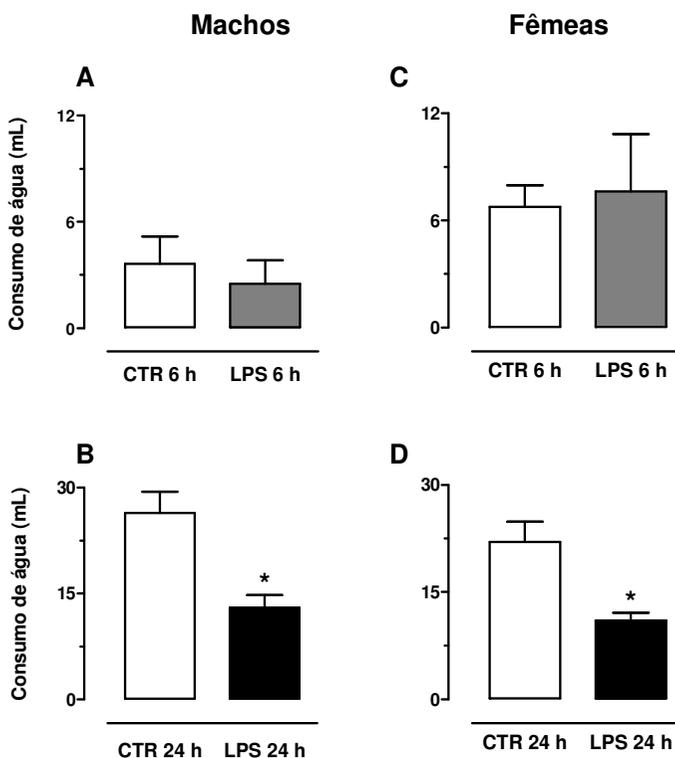


Figura 10: Ingestão hídrica de ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados representam média \pm EPM de 7 a 8 animais por grupo. A análise estatística utilizada foi o teste *t*

de *Student*. * indica $P < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle.

Na avaliação hematológica, as fêmeas apresentaram redução do número de leucócitos no grupo LPS 6 h, o que não ocorreu no grupo de machos (Tabela 2). Um padrão similar, porém, de redução dos linfócitos, monócitos, e plaquetas, assim como de elevação do número de granulócitos, foi caracterizado nos animais do grupo LPS 6 h, tanto em machos, quanto em fêmeas. A linfopenia e a plaquetopenia permaneceram significativamente reduzidas em ambos os gêneros dos grupos LPS 24 h. Da mesma forma, o aumento do número de granulócitos persistiu nos animais LPS 24 h, sem distinção de gênero. Somente as fêmeas do grupo LPS 24 h, porém, apresentaram leucocitose. Não houve diferenças significativas nos valores de hematócrito dos animais.

Tabela 2: Perfil hematológico e urinário de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.

	Machos			Fêmeas		
	Controle	LPS 6 h	LPS 24 h	Controle	LPS 6 h	LPS 24 h
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	11,7 ± 0,9	11,0 ± 2,0	14,6 ± 2,1	13,0 ± 0,5	8,8 ± 0,5*	15,3 ± 0,9**#
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,5 ± 0,6	2,2 ± 0,5*	3,1 ± 0,5*	7,8 ± 0,3	1,7 ± 0,1*	2,4 ± 0,1**#
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	1,0 ± 0,08	0,4 ± 0,09*	1,3 ± 0,2#	1,5 ± 0,1	0,5 ± 0,09*	1,8 ± 0,3#
Granulócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	3,2 ± 0,2	8,7 ± 1,8*	10 ± 1,4*	3,6 ± 0,4	6,6 ± 0,4*	11 ± 0,6**#
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	1.030 ± 38	359 ± 59*	247 ± 48*	1.069 ± 40	324 ± 34*	138 ± 13**#
Hematócrito (%)	46 ± 0,6	46 ± 0,8	46 ± 1,4	47 ± 1,1	47 ± 0,8	46 ± 1,2
Glicemia (mg/dL)	100 ± 3	77 ± 6*	71 ± 7*	92 ± 2	73 ± 5*	63 ± 4*
NO_x^a plasmático (μM)	15,4 ± 4,2	470 ± 55,3*	335 ± 97*	16,8 ± 10,5	508 ± 29,2*	341 ± 40,7**#
Densidade urinária	1.024 ± 0,005	1.007 ± 0,008	1.005 ± 0,02	1.000 ± 0,01	0,96 ± 0,02	1.016 ± 0,006
pH urinário	7,4 ± 0,1	5,7 ± 0,2*	6,1 ± 0,1*	7,6 ± 0,2	6,0 ± 0,2*	5,2 ± 0,1**#

Os resultados representam média ± EPM de 5 a 8 animais por grupo. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e LPS 6 h, respectivamente. ^a NO_x , concentrações plasmáticas de nitrito + nitrato.

Todos os grupos LPS (6 e 24 h) de ambos os gêneros, apresentaram hipoglicemia, se comparados ao controle. De maneira similar, os ratos machos e fêmeas, apresentaram aumento significativo dos valores plasmáticos de NO_x , tanto nos grupos LPS 6 h como LPS 24 h. Houve redução do pH urinário em todos os grupos LPS (6 e 24 h) de ambos os gêneros, a qual foi significativamente mais intensa nas fêmeas do grupo LPS 24 h (Tabela 2). A densidade urinária não sofreu mudanças significativas após a aplicação do lipopolissacarídeo.

4.1.2 Confirmação do choque endotóxico em ratos machos e fêmeas submetidos à aplicação de LPS

A avaliação da pressão arterial sistólica, evidenciou a presença de hipotensão arterial, tanto nos machos, quanto nas fêmeas dos grupos LPS 6 horas. Após 24 horas (grupo LPS 24 h), entretanto, os valores da pressão arterial se normalizaram em todos os grupos (Figura 11).

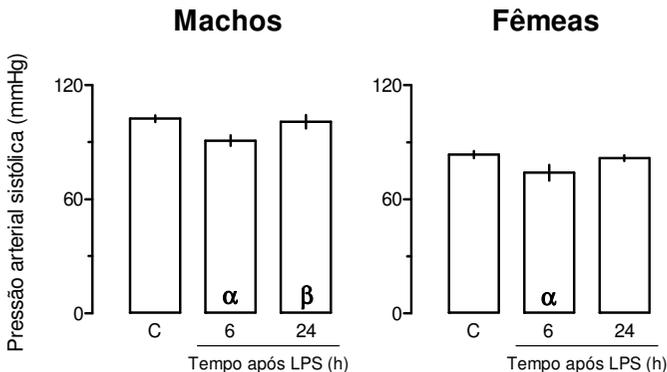


Figura 11: Pressão arterial dos ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados representam média \pm EPM de 7 a

8 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados do grupo Controle. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α e β indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e LPS 6 h correspondentes, respectivamente.

A análise inter-gênero (machos vs fêmeas) dos valores basais da pressão arterial sistólica demonstrou que as fêmeas do grupo controle apresentavam uma pressão arterial aproximadamente 15 mmHg abaixo dos valores encontrados nos machos do grupo correspondente (Tabela 3). Essa proporção foi mantida nos animais endotoxêmicos, ou seja, dos grupos LPS 6 e 24 horas.

Tabela 3: Análise inter-gênero da pressão arterial sistólica de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.

	Valores basais	
	Machos	Fêmeas
Pressão arterial sistólica (mmHg)		
Controle	102,3 ± 1,8	83,5 ± 1,8
LPS 6 h	90,8 ± 2,7	74,0 ± 4,1*
LPS 24 h	100,7 ± 3,5	81,7 ± 1,5*

Os resultados representam média ± EPM de 7 a 8 animais por grupo. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos de ratos machos. Por conveniência, a tabela demonstra apenas as diferenças estatísticas entre machos e fêmeas que

receberam o mesmo tratamento, pois diferenças adicionais foram mostradas na Figura 11.

4.1.3 Avaliação da responsividade cardiovascular (pressão arterial) a doses crescentes de fenilefrina durante o choque endotóxico

Os grupos LPS 6 h de ambos os gêneros apresentaram respostas significativamente reduzidas para a fenilefrina (Figura 12) quando administrou-se a dose de 30 nmol/kg, i.v com o intuito de se aumentar a pressão arterial sistólica

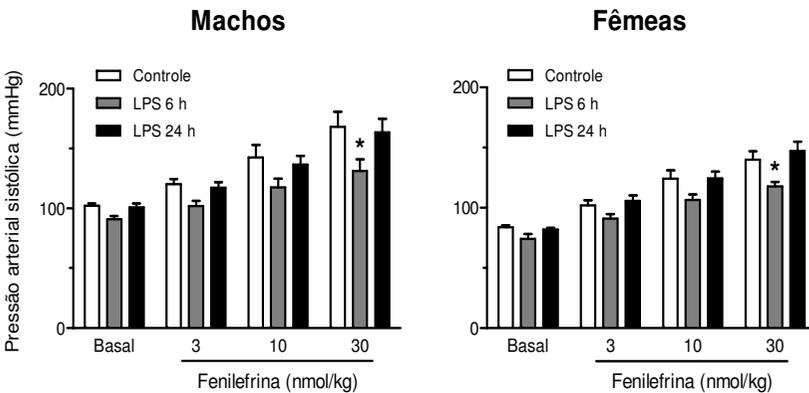


Figura 12: Efeitos da fenilefrina na pressão arterial sistólica de ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados representam média \pm EPM de 7 a 8 animais por grupo. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

4.1.4 Comparação dos efeitos da endotoxemia na funcionalidade cardíaca de ratos machos e fêmeas antes e após a administração de fenilefrina

A análise da função da bomba cardíaca por meio dos parâmetros frequência cardíaca, volume sistólico e débito cardíaco de machos e fêmeas pertencentes aos grupos controle (não-endotoxêmicos) não demonstrou diferenças significativas entre as frequências cardíacas basais. Já os parâmetros volume sistólico e o débito cardíaco apresentaram valores inferiores nas fêmeas do grupo controle, quando comparados aos valores obtidos em ratos machos do grupo controle. Essa diferença entre os gêneros persistiu nos animais do grupo LPS 6 h, mas não entre os grupos LPS 24 h (Tabela 4). A administração de 30 nmol/kg, i.v de fenilefrina não determinou diferenças significativas no perfil dos parâmetros avaliados, exceto pelo surgimento da diferença entre as frequências cardíacas de machos e fêmeas do grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4: Análise inter-gênero da função de bomba cardíaca antes e após a administração de fenilefrina em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.

	Valores basais		Pós-fenilefrina (30 nmol/kg, i.v.) ^a	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
<i>Frequência cardíaca (bpm)</i>				
Controle	294,7 ± 12,3	279,4 ± 11,4	332,4 ± 11,5	284,5 ± 6,8*
LPS 6 h	354,8 ± 7,3	357,4 ± 8,3	350,1 ± 10,9	358,0 ± 11,1
LPS 24 h	329,8 ± 13,1	377,9 ± 8,2	333,0 ± 12,4	335,0 ± 14,9
<i>Volume Sistólico (μL)</i>				
Controle	109,7 ± 7,2	67,9 ± 7,8*	93,7 ± 4,5	64,9 ± 8,6*
LPS 6 h	73,6 ± 6,0	50,7 ± 3,2*	79,9 ± 5,9	57,1 ± 5,4*
LPS 24 h	76,9 ± 5,6	83,8 ± 6,4	80,8 ± 8,1	79,1 ± 7,2
<i>Débito Cardíaco (mL/min)</i>				
Controle	32,3 ± 2,3	19,0 ± 2,3*	30,6 ± 2,0	18,2 ± 2,2*
LPS 6 h	26,4 ± 2,2	18,2 ± 1,5*	27,9 ± 2,1	20,6 ± 2,5
LPS 24 h	25,0 ± 1,9	31,7 ± 2,6	27,1 ± 3,5	26,1 ± 2,8

Os resultados representam média ± EPm de 5 a 8 animais por grupo.^a Resultados durante o pico do efeito pressórico da fenilefrina. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos de ratos machos. Por conveniência, a tabela demonstra apenas as diferenças estatísticas entre machos e fêmeas que receberam o mesmo tratamento, pois diferenças adicionais estão mostradas na Figura 13.

A administração de LPS induziu a taquicardia em machos e fêmeas, tanto nos grupos LPS 6 como 24 horas (Figura 13, A e D, respectivamente). O volume sistólico foi reduzido somente nos ratos machos, tanto do grupo LPS 6 como o LPS 24 h. O débito cardíaco dos ratos machos não foi alterado pela endotoxemia (Figura 13, B e C, respectivamente). Com perfil oposto ao observado nos machos, fêmeas do grupo LPS 24 h apresentaram aumento no volume sistólico e no débito cardíaco (Figura 13, E e F, respectivamente). A administração de fenilefrina (30 nmol/kg) não induziu nenhuma diferença significativa na frequência cardíaca, volume sistólico ou débito cardíaco em nenhum grupo experimental (Figura 13, A a F, círculos abertos).

Não houve diferença significativa na avaliação intergênero da fração de ejeção, enquanto dP/dt_{max} , $P@dP/dt_{max}$ e trabalho sistólico, apresentaram valores menores em fêmeas dos grupos controle e LPS 6 h quando comparadas aos machos. Por outro lado, a fração de ejeção foi estatisticamente diferente entre machos e fêmeas dos grupos LPS 24 horas, bem como a diferença do trabalho sistólico deixou de ocorrer (Tabela 5). A administração da fenilefrina não modificou o perfil das diferenças entre os machos e fêmeas, com exceção à fração de ejeção dos grupos LPS 24 horas (Tabela 5).

fenilefrina (30 nmol/kg). A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a fenilefrina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α e β indicam $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle e LPS 6 h, respectivamente.

Tabela 5: Comparação inter-gênero de índices sistólicos ventriculares dependentes de volume antes e após a administração de fenilefrina em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.

	Valores basais			<i>Fêmeas</i>	<i>Machos</i>	<i>Fêmeas</i>
	<i>Machos</i>	<i>Fêmeas</i>	<i>Machos</i>			
<i>Fração de ejeção (%)</i>						
<i>Controle</i>	72,0 ± 6,5	70,4 ± 8,0	57,8 ± 5,1	49,2 ± 7,8		
<i>LPS 6 h</i>	40,0 ± 3,2	37,9 ± 4,5	39,9 ± 4,3	33,5 ± 3,5		
<i>LPS 24 h</i>	57,1 ± 5,9	76,0 ± 3,8*	49,7 ± 6,1	42,6 ± 3,4		
<i>dP/dt_{max} (mmHg/s)</i>						
<i>Controle</i>	6276 ± 370	5063 ± 320*	8653 ± 544	6975 ± 319*		
<i>LPS 6 h</i>	4077 ± 301	3035 ± 277*	5914 ± 390	4737 ± 189*		
<i>LPS 24 h</i>	4943 ± 295	4602 ± 237*	6765 ± 514	6714 ± 268		

$P@dP/dt_{max}$ (mmHg)					
Controle	70,0 ± 5,1	48,5 ± 1,9*	104,6 ± 8,8	76,6 ± 2,2*	
LPS 6 h	53,3 ± 3,3	39,2 ± 3,3*	75,8 ± 3,7	62,1 ± 2,2*	
LPS 24 h	57,8 ± 3,5	48,4 ± 3,0*	78,1 ± 3,1	72,9 ± 2,8*	
Trabalho Sistólico					
(mmHg* μ L)					
Controle	8772 ± 415	4593 ± 613*	9011 ± 600	6073 ± 869*	
LPS 6 h	5216 ± 520	2707 ± 213*	6868 ± 830	3932 ± 384*	
LPS 24 h	5524 ± 734	5564 ± 363	5940 ± 578	6731 ± 1011	

^a Resultados durante o pico do efeito pressórico da fenilefrina. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos de ratos machos.

Tanto em machos como em fêmeas, a análise dos parâmetros da função sistólica ventricular dependentes de volume mostraram um padrão similar de redução da fração de ejeção, do dP/dt_{max} , do $P@dP/dt_{max}$, e do trabalho sistólico nos animais do grupo LPS 6 horas quando comparados ao grupo controle (Figura 14, A-H). Com exceção da fração de ejeção, todos estes parâmetros permaneceram significativamente reduzidos nos machos 24 horas após a administração do LPS, incluindo quando os parâmetros foram avaliados durante o pico do efeito hipertensivo induzido pela fenilefrina (Figura 14, B-D, círculos abertos em cima das barras). Por outro lado, as fêmeas do grupo LPS 24 h não apresentaram os índices dP/dt_{max} , $P@dP/dt_{max}$, e trabalho sistólico estatisticamente diferentes antes (barras) ou após (círculos) a administração de fenilefrina, quando comparados ao seu respectivo grupo controle (Figura 14, E-H).

endotoxemia. Os resultados representam média \pm EPM de 7 a 8 animais por grupo. Os círculos abertos representam os resultados durante o efeito máximo após a administração de fenilefrina (30 nmol/kg). A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a fenilefrina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α e β , * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle e LPS 6 h, antes e após a administração de fenilefrina, respectivamente.

A avaliação dos parâmetros da função sistólica ventricular esquerda independentes de volume revelou não haver redução dos parâmetros contráteis dP/dt_{\max} – EDV (Figura 15, B e E) e ESPVR (Figura 15, C e F) em ambos os gêneros durante o choque endotóxico. Por outro lado, o PRSW, demonstrou-se reduzido em machos e fêmeas do grupo LPS 6 h, mas permaneceu reduzido apenas nos machos do grupo LPS 24 h (Figura 15, A e D).

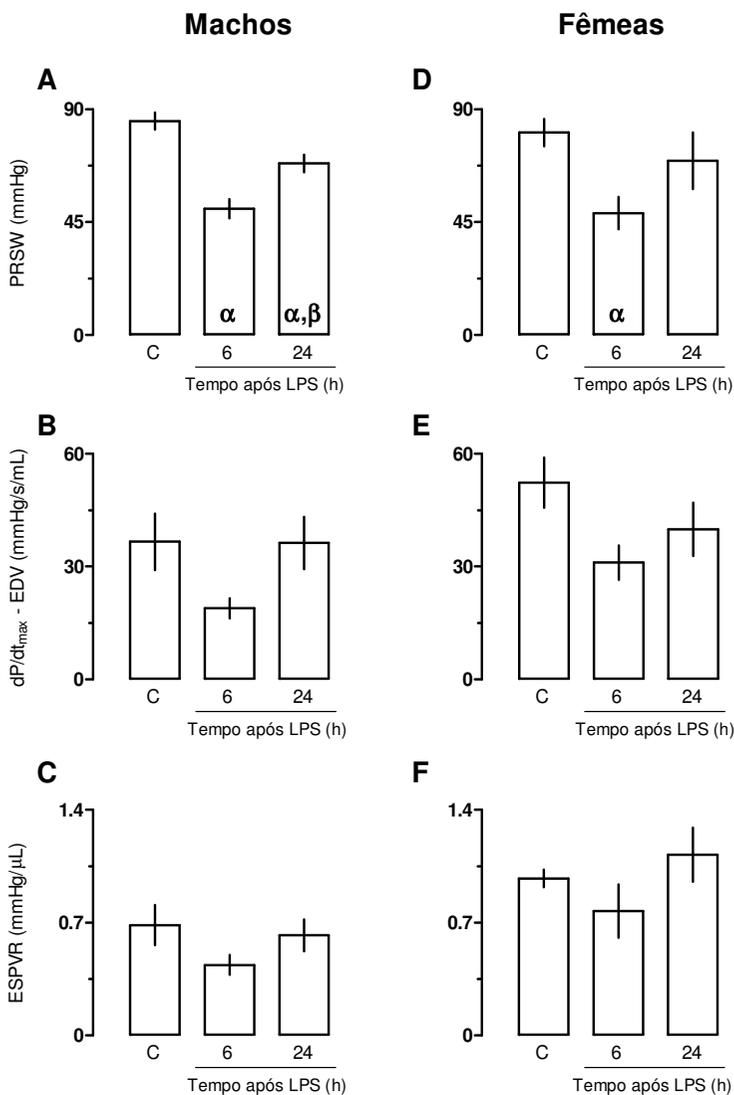


Figura 15: Índices sistólicos do ventrículo esquerdo independentes de volume em ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados representam média \pm EPM de 7 a 8 animais por grupo. Os círculos abertos representam os

resultados durante o efeito máximo após a administração de fenilefrina (30 nmol/kg). A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a fenilefrina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α e β , * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle e LPS 6 h, antes e após a administração de fenilefrina, respectivamente.

Os índices diastólicos dP/dt_{\min} e *Tau* apresentaram redução e aumento significativos apenas em fêmeas do grupo LPS 6 h quando comparados com o grupo controle (Figuras 16, A e D; B e E, respectivamente). O tratamento com LPS não alterou o volume diastólico final (EDV) tanto em machos como em fêmeas em ambos os tempos (6 e 24 horas) (Figura 16, C e F). O grupo LPS 24 h de fêmeas, entretanto, apresentou um aumento significativo do EDV durante o efeito pressórico da fenilefrina (Figura 16F, círculos abertos).

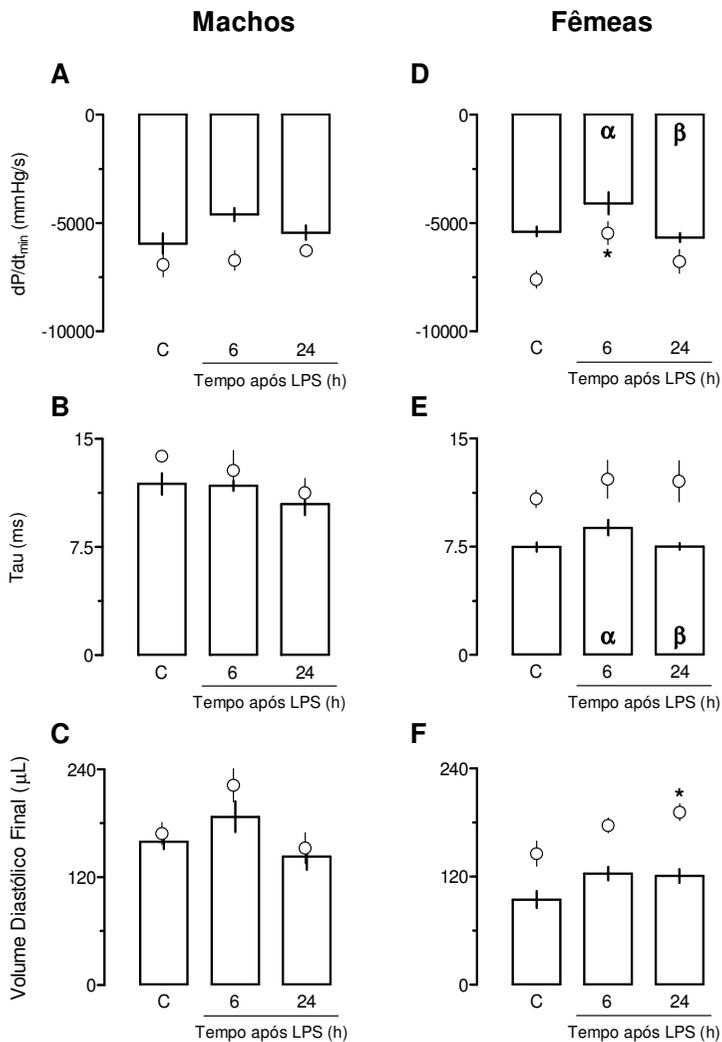


Figura 16: Índices diastólicos do ventrículo esquerdo em ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados representam média \pm EPM de 7 a 8 animais por grupo. Os círculos abertos representam os resultados durante o efeito máximo após a administração de fenilefrina (30 nmol/kg). A

letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a fenilefrina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α e β , * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle e LPS 6 h, antes e após a administração de fenilefrina, respectivamente.

A análise inter-gênero dos animais revelou diferenças significativas nos índices *Tau* e EDV entre os grupos controle. Não foi mais observada diferença do EDV entre os gêneros, 24 horas após a aplicação do LPS (Tabela 6).

Tabela 6: Análise inter-gênero de índices diastólicos do ventrículo esquerdo antes de depois da administração de fenilefrina em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.

	Valores basais		Pós-fenilefrina (30 nmol/kg, i.v.) ^a	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
<i>dP/dt_{min}</i> (mmHg/s)				
<i>Controle</i>	-5946 ± 466	-5391 ± 226	-7293 ± 576	-7989 ± 409
<i>LPS 6 h</i>	-4595 ± 307	-4084 ± 508	-7100 ± 458	-5853 ± 533
<i>LPS 24 h</i>	-5445 ± 338	-5667 ± 208	-6656 ± 240	-7161 ± 542
<i>Tau</i> (ms)				
<i>Controle</i>	11,8 ± 0,7	7,4 ± 0,3*	13,9 ± 0,3	10,8 ± 0,6
<i>LPS 6 h</i>	11,7 ± 0,3	8,8 ± 0,5	12,8 ± 1,3	12,2 ± 1,3
<i>LPS 24 h</i>	10,4 ± 0,7	7,5 ± 0,2	11,2 ± 1,0	12,0 ± 1,4
<i>Volume diastólico final</i> (μ L)				
<i>Controle</i>	159,3 ± 8,2	94,5 ± 9,4*	167,6 ± 12,2	142,0 ± 13,9
<i>LPS 6 h</i>	187,3 ± 17,2	123,2 ± 7,5*	207,6 ± 20,5	173,4 ± 8,2
<i>LPS 24 h</i>	142,9 ± 14,8	120,6 ± 7,5	151,4 ± 17,2	188,0 ± 9,3

Os resultados representam média \pm EPM de 5 a 8 animais por grupo. ^a Resultados durante o pico do efeito pressórico da fenilefrina. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos de ratos machos.

O volume sistólico final aumentou em machos e fêmeas dos grupos LPS 6 h quando comparados aos respectivos grupos controle, mas não com os animais do grupo LPS 24 horas (Figura 17). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos valores do volume sistólico final entre machos e fêmeas dos grupos controle e LPS 6 h; enquanto uma diferença pôde ser observada entre os animais LPS 24 h (Tabela 7).

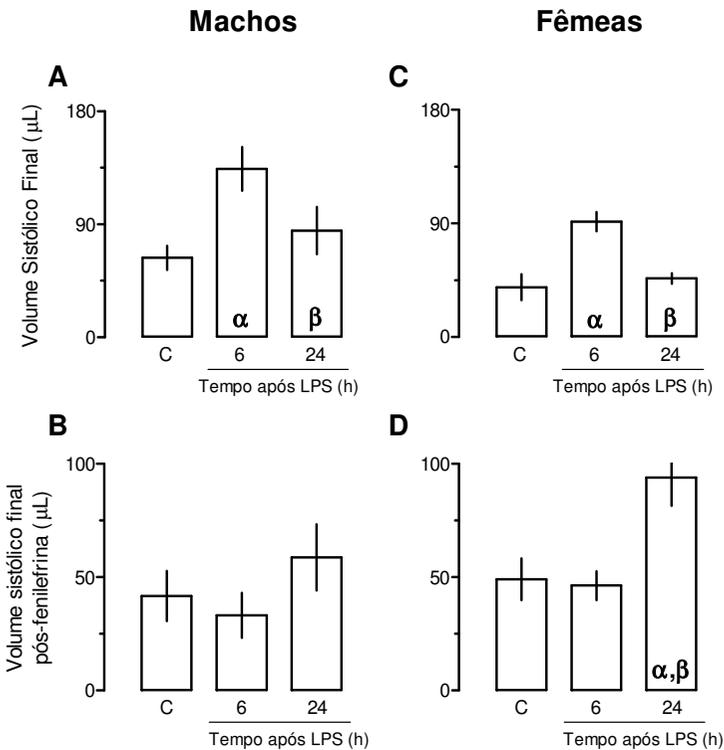


Figura 17: Volume sistólico final do ventrículo esquerdo em ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados representam média \pm EPM de 7 a 8 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise

estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a fenilefrina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α e β indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo controle e LPS 6 h, respectivamente.

Tabela 7: Análise inter-gênero do volume sistólico final em ratos machos e fêmeas com endotoxemia.

	Valores basais		Pós-fenilefrina (30 nmol/kg, i.v.) ^a	
	<i>Machos</i>	<i>Fêmeas</i>	<i>Machos</i>	<i>Fêmeas</i>
<i>Volume sistólico final (μL)</i>				
<i>Controle</i>	63,3 ± 9,6	39,3 ± 10,3	111,3 ± 12,9	88,4 ± 15,6
<i>LPS 6 h</i>	134,0 ± 17,3	91,2 ± 7,7	158,9 ± 15,4	137,6 ± 9,3
<i>LPS 24 h</i>	84,9 ± 18,7	46,3 ± 4,1*	128,6 ± 14,8	140,3 ± 11,4

^a Resultados durante o pico do efeito pressórico da fenilefrina. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos de ratos machos. Por conveniência, a tabela demonstra apenas as diferenças estatísticas entre machos e fêmeas que receberam o mesmo tratamento, pois diferenças adicionais estão mostradas na Figura 17.

4.2 PARTE 2: AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR *IN SITU* EM RATOS MACHOS SUBMETIDOS À CIRURGIA DE LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL (CLP)

4.2.1 Mortalidade induzida pela técnica de CLP utilizada

Um total de 50% dos animais submetidos à cirurgia de CLP sobreviveram no período avaliado de 120 horas. As mortes (50%) ocorreram entre 48 e 72 horas após a cirurgia (Figura 18). Em virtude desta taxa de mortalidade (que foi padronizada), os demais experimentos foram realizados com animais em momentos 24 e 48 horas após a cirurgia de CLP (grupos CLP 24 h e 48 h, respectivamente).

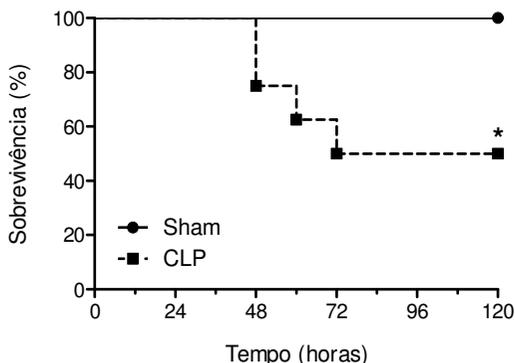


Figura 18: Mortalidade de ratos machos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP). Os resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência e representam uma avaliação de 10 animais por grupo. A análise estatística utilizada foi o teste de log-rank. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo sham.

4.2.2 Alterações hematológicas em ratos machos após cirurgia de CLP

A análise hematológica demonstrou leucopenia apenas nos animais do grupo CLP 24 h, ao passo que ambos os grupos, CLP 24 e 48 horas apresentaram redução significativa do número de linfócitos, plaquetas e da glicose sanguínea (Tabela 9). Não foram observadas diferenças nas contagens dos granulócitos, monócitos e no hematócrito entre os animais estudados.

Tabela 8: Análise hematológica de ratos machos submetidos à cirurgia de CLP.

	Controle	CLP 24 h	CLP 48 h
Leucometria ($10^3/\mu\text{L}$)	$11,0 \pm 0,8$	$5,9 \pm 1,2^*$	$8,8 \pm 1,1$
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$7,7 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,3^*$	$4,9 \pm 0,6^{*\#}$
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$0,6 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
Granulócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$2,3 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,5$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	892 ± 47	$529 \pm 57^*$	$552 \pm 39^*$
Hematócrito (%)	$43 \pm 0,8$	$43 \pm 2,2$	$43 \pm 1,3$
Glicemia (mg/dL)	106 ± 3	$71 \pm 5^*$	$54 \pm 8^*$

Os resultados representam a média \pm EPM de 6 a 7 animais por grupo. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de

Newman-Keuls. * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e CLP 24 h, respectivamente.

4.2.3 Caracterização do choque séptico em ratos machos após cirurgia de CLP

A avaliação da pressão arterial (sistólica, diastólica e média) evidenciou a presença de hipotensão arterial somente nos animais submetidos a cirurgia de CLP 48 horas antes (grupo CLP 48 h) (Figura 19).

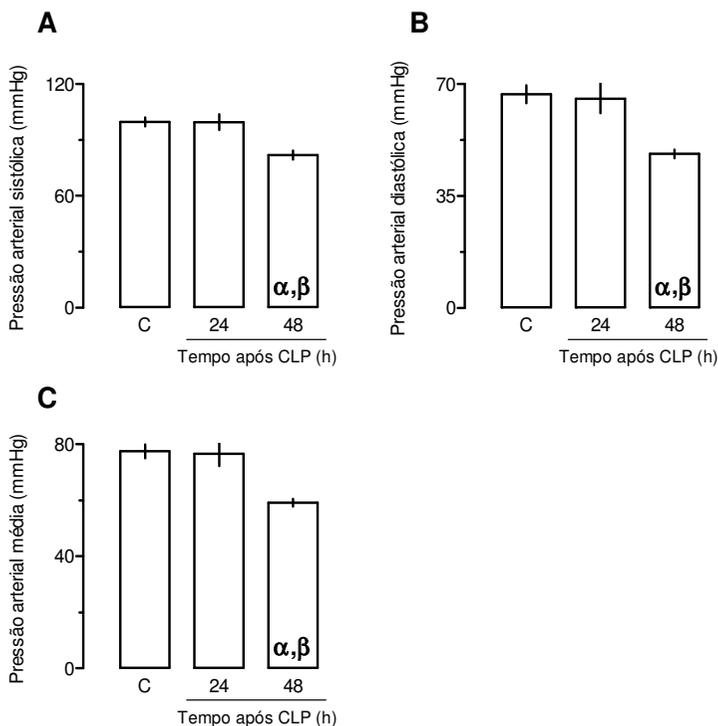


Figura 19: Pressão arterial sistólica (A), diastólica (B) e média (C) de ratos machos submetidos à cirurgia de CLP. Os resultados representam a média \pm EPM de 7 a 8 animais por

grupo. A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α e β indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e CLP 24 h, respectivamente.

4.2.4 Avaliação da responsividade cardiovascular (pressão arterial) a doses crescentes de noradrenalina e dobutamina

Foi observada uma resposta reduzida hipertensora à noradrenalina na dose de 1 nmol/kg no grupo CLP 48 horas quando comparada aos grupos controle e CLP 24 h (Figura 20, A). Se comparado o valor da pressão arterial sistólica obtida com a dose de 1 nmol/kg de noradrenalina, entretanto, é possível verificar que a mesma foi capaz de corrigir a hipotensão caracterizada pelo valor basal obtido do mesmo grupo ($81,8 \pm 2,4$ vs $108,0 \pm 5,0$ mmHg para valores basal e após 1 nmol/kg de noradrenalina do grupo CLP 48 h, respectivamente). Quando a dobutamina foi utilizada, somente a dose de 30 nmol/kg foi capaz de corrigir a pressão arterial dos animais do grupo CLP 48 h quando comparadas aos grupos controle ($99,6 \pm 2,4$ vs $102,8 \pm 3,5$ mmHg para os grupos controle-pressão arterial basal e CLP 48 h-pressão arterial após 30 nmol/kg de dobutamina, respectivamente) (Figura 20, B).

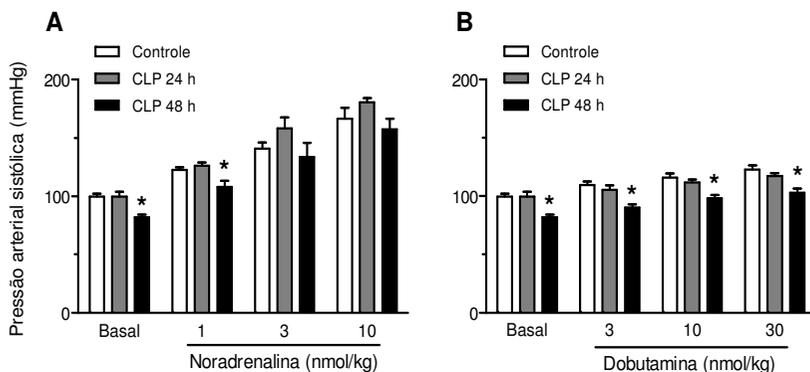


Figura 20: Efeitos da noradrenalina (A) e dobutamina (B) na pressão arterial sistólica de ratos machos com choque séptico. Os resultados mostrados representam a média \pm EPM de 7 a 8 animais por grupo. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle.

De acordo com os resultados encontrados da pressão arterial sistólica após a realização das curvas dose-resposta para a noradrenalina e dobutamina, ou seja, com a normalização da pressão arterial nas doses de 1 e 30 nmol/kg - i.v, respectivamente, uma análise *in situ* da funcionalidade cardíaca foi considerada para as respectivas doses supracitadas destes fármacos.

4.2.5 Efeitos do choque séptico na funcionalidade e reatividade cardiovascular às drogas noradrenalina e dobutamina

A avaliação da função da bomba cardíaca por meio dos parâmetros basais frequência cardíaca, volume sistólico e débito cardíaco não demonstrou diferenças significativas entre os animais CLP 24 e 48 horas e o grupo controle (Figura 21, A-F; representado pelas barras). Os animais dos grupos CLP 24 e 48 h apresentaram, entretanto, um perfil oposto com aumento e redução da frequência cardíaca, respectivamente (Figura 21, A). A administração da noradrenalina não alterou significativamente os valores da frequência cardíaca nos grupos controle, enquanto a dobutamina determinou aumento significativo. Este perfil foi mantido nos animais dos grupos CLP 24 e 48 h, possibilitando retorno da frequência cardíaca do grupo CLP 48 h para valor similar ao grupo controle antes da administração da dobutamina (Figura 21, A e D; triângulos e quadrados abertos, respectivamente).

Apesar da ausência de diferenças significativas do volume sistólico e débito cardíaco entre os grupos controle, CLP 24 e 48 h após a administração da noradrenalina ou dobutamina (Figura 21, B e E, C e F, respectivamente; triângulos abertos para noradrenalina e quadrados abertos para dobutamina), é possível observar elevações de ambos parâmetros somente com o uso da dobutamina, especialmente nos animais do grupo CLP 48 h (Figura 21 E e F; quadrados abertos).

dobutamina (30 nmol/kg), respectivamente. A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a administração de noradrenalina e dobutamina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. β , * e # indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo CLP 24 h, antes e após a administração de noradrenalina e dobutamina, respectivamente.

A despeito da hipotensão arterial compatível com o quadro de choque séptico após 48 horas da cirurgia de CLP, a análise dos parâmetros basais da função sistólica ventricular esquerda dependentes de volume, tais como, fração de ejeção, dP/dt_{max} , e trabalho sistólico não apresentaram alterações significativas entre os animais dos grupos controle, CLP 24 e 48 horas (Figura 22, A, B e D; barras). O índice $P@dP/dt_{max}$, porém, mostrou-se reduzido nos animais do grupo CLP 48 h quando comparados ao grupo controle (Figura 22 C). Mesmo com a administração de dobutamina essa redução significativa de $P@dP/dt_{max}$ persistiu no grupo CLP 48 h, a qual, porém, foi corrigida pela administração de noradrenalina (Figura 22, C e G). O perfil de resposta da fração de ejeção, dP/dt_{max} , e do trabalho sistólico entre os grupos controle, CLP 24 e 48 h não se alterou após as administrações de noradrenalina e dobutamina (Figura 22 A e E; B e F; D e H, respectivamente; triângulos abertos para noradrenalina e quadrados abertos para dobutamina).

séptico antes e após a administração de noradrenalina e dobutamina. Os resultados mostrados representam a média \pm EPM de 7 a 8 animais por grupo. Os triângulos e quadrados abertos representam os resultados durante o efeito máximo após a administração de noradrenalina (1 nmol/kg) e dobutamina (30 nmol/kg), respectivamente. A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a administração de noradrenalina e dobutamina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α , β , e * indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e CLP 24 h, antes e após a administração de noradrenalina e dobutamina, respectivamente.

Os parâmetros sistólicos do ventrículo esquerdo independentes de volume PRSW, dP/dt_{\max} -EDV, e ESPVR não apresentaram diferenças significativas nos animais submetidos à cirurgia de CLP 24 e 48 horas antes (Figura 23, A-C).

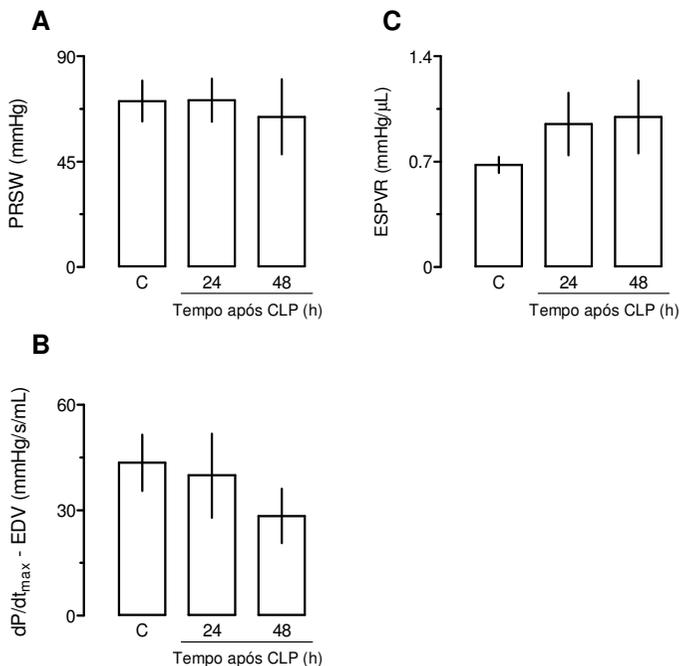


Figura 23: Índices sistólicos do ventrículo esquerdo independentes de volume em ratos machos com choque séptico induzido pela cirurgia de CLP. Os resultados representam média \pm EPM de 5 a 7 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados do grupo Controle. A análise estatística utilizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Quando os valores basais dos índices diastólicos dP/dt_{min} e Tau foram avaliados nos animais submetidos à cirurgia de CLP, uma diferença significativa do dP/dt_{min} foi observada entre os grupos CLP 24 e 48 h (Figura 24, A-E; barras). As administrações tanto de noradrenalina, quanto de dobutamina não determinaram alterações significativas quando comparadas aos valores basais (Figura 24, A e D;

triângulos e quadrados abertos, respectivamente). Igualmente, não existiram variações significativas dos valores do volume diastólico final entre os grupos controle, CLP 24 e 48 h, antes ou após as administrações de noradrenalina e dobutamina (Figura 24, C e F; barras, triângulos e quadrados, respectivamente).

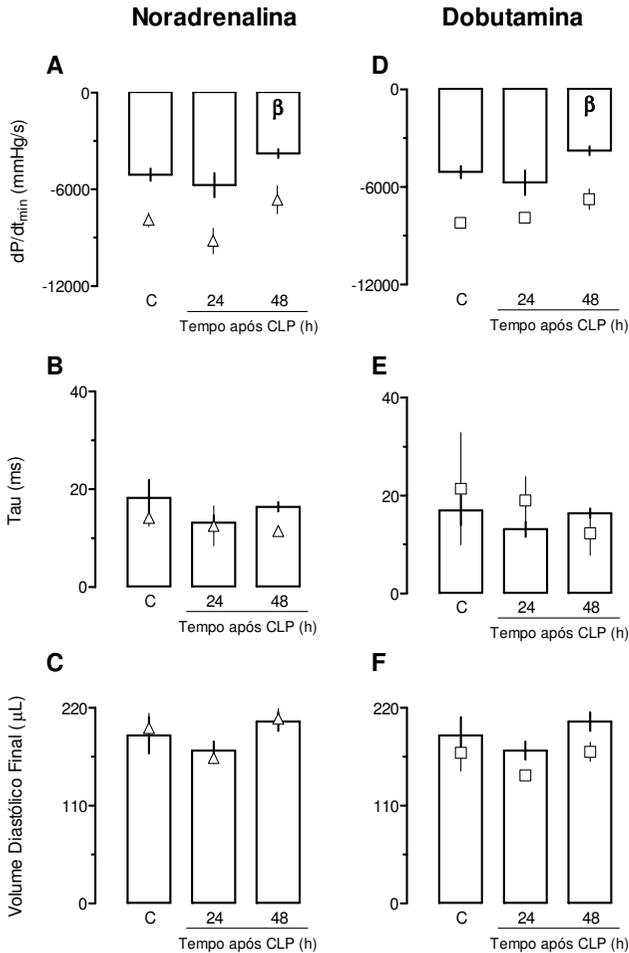


Figura 24: Índices diastólicos do ventrículo esquerdo em ratos machos com choque séptico induzido pela cirurgia de

CLP. Os resultados mostrados representam a média \pm EPM de 7 a 8 animais por grupo. Os triângulos e quadrados abertos representam os resultados durante o efeito máximo após a administração de noradrenalina (1 nmol/kg) e dobutamina (30 nmol/kg), respectivamente. A letra “C” indica os resultados do grupo Controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a administração de noradrenalina e dobutamina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. β indica $P < 0,05$ em relação ao grupo CLP 24 h.

4.3 PARTE 3: DIFERENÇAS FUNCIONAIS E DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CARDÍACAS RESPONSÁVEIS PELO TRÁFEGO DO ÍON CÁLCIO EM RATOS MACHOS SUBMETIDOS AO CHOQUE ENDOTÓXICO E SÉPTICO

4.3.1 Comparação das alterações funcionais cardiovasculares e de resposta à dobutamina de acordo com diferentes modelos experimentais de sepse

Em ambos os modelos experimentais de sepse, de administração de LPS ou cirurgia de CLP, a hipotensão arterial pôde ser observada 6 e 48 horas após os respectivos procedimentos (Figura 25, A e B representado pelas barras, respectivamente). A administração de 30 nmol/kg de dobutamina-i.v corrigiu a hipotensão dos grupos LPS 6 h e CLP 24 h, embora possa ser observada uma hiporresponsividade à dobutamina quando os resultados são comparados com dos respectivos grupos controle (Figura 25, A e B, representado pelos quadrados abertos).

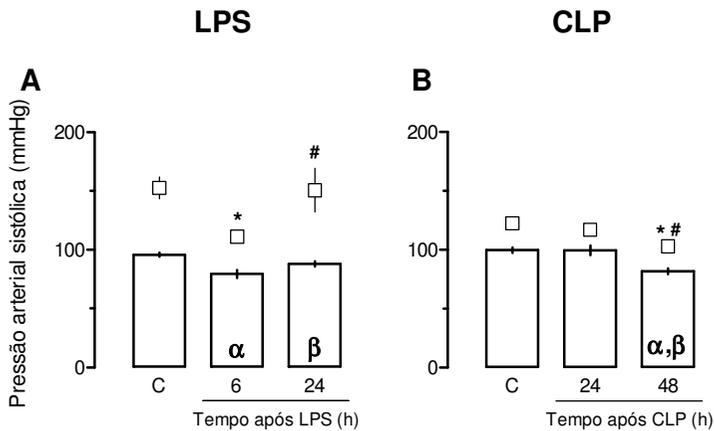


Figura 25: Pressão arterial sistólica de ratos machos endotoxêmicos (LPS) ou sépticos (CLP) antes e após administração de dobutamina. Os resultados representam média \pm EPM de 6 a 8 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados dos respectivos grupos controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a administração de dobutamina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α , β , * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e LPS 6 h ou CLP 24 h, antes e após a administração de dobutamina, respectivamente.

A administração de dobutamina elevou significativamente as frequências cardíacas nos animais dos grupos controle (251 ± 12 vs 355 ± 10 e 294 ± 16 vs 370 ± 18 bpm para os modelos de LPS e CLP, respectivamente) (Figura 26, A e C, representado pelas barras e quadrados abertos, respectivamente). De maneira interessante, apenas o grupo LPS 24 h não apresentou aumento da frequência cardíaca pela

administração de dobutamina, quando comparado com os demais grupos, controle e LPS 6 h (Figura 26, A, representado pelos quadrados abertos). Esta ausência de aumento da frequência cardíaca após a administração da dobutamina esteve associada com a não alteração do débito cardíaco no mesmo grupo LPS 24 h, enquanto dos demais grupos controle e LPS 6 h tiveram aumento (Figura 26, B, representado pelo quadrado aberto). Tanto os animais do grupo CLP 24 h como os do grupo CLP 48 h, por sua vez, apresentaram elevações da frequência cardíaca e do débito cardíaco, não havendo diferenças entre os grupos estudados, CLP 24 e 48 h (Figura 26, C e D, representado pelas barras e quadrados abertos).

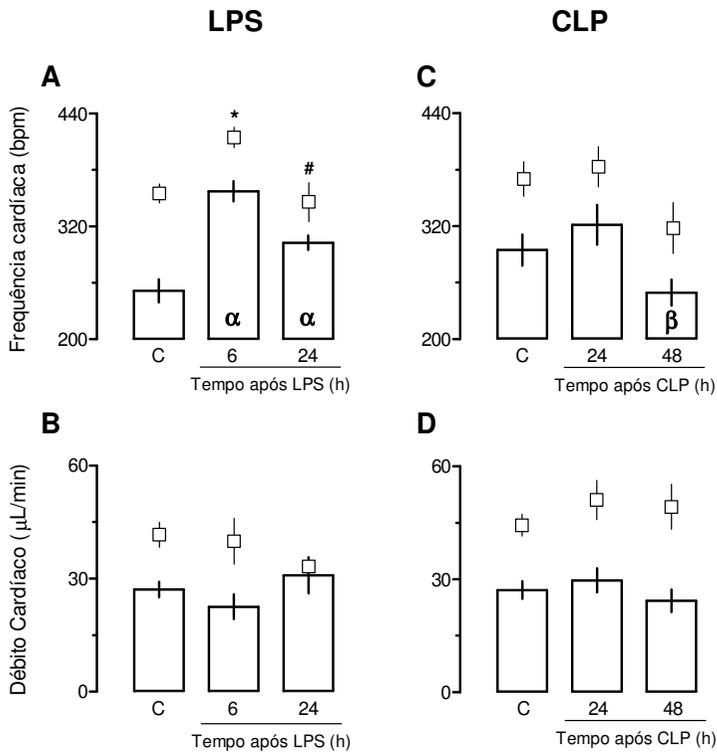


Figura 26: Frequência cardíaca e débito cardíaco de ratos machos endotoxêmicos (LPS) ou sépticos (CLP) antes e após administração de dobutamina. Os resultados representam média \pm EPM de 6 a 8 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados dos respectivos grupos controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a administração de dobutamina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α , β , * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e LPS 6 h ou CLP 24 h, antes e após a administração de dobutamina, respectivamente.

Somente o grupo LPS 6 h apresentou queda da fração de ejeção e do índice dP/dt_{max} entre os animais de ambos os modelos de LPS e CLP (Figura 27, A-D, representado pelas barras). A administração de dobutamina foi capaz de elevar a fração de ejeção somente do grupo LPS 6 h e de ambos grupos CLP 24 e 48 h, não alterando, portanto, os valores dos animais do grupo LPS 24 h (Figura 27, A e C, representado pelos quadrados abertos). Diferentemente, a dobutamina igualmente elevou o dP/dt_{max} em todos os animais dos grupos experimentais LPS e CLP (Figura 27, B e D, representado pelos quadrados abertos, respectivamente).

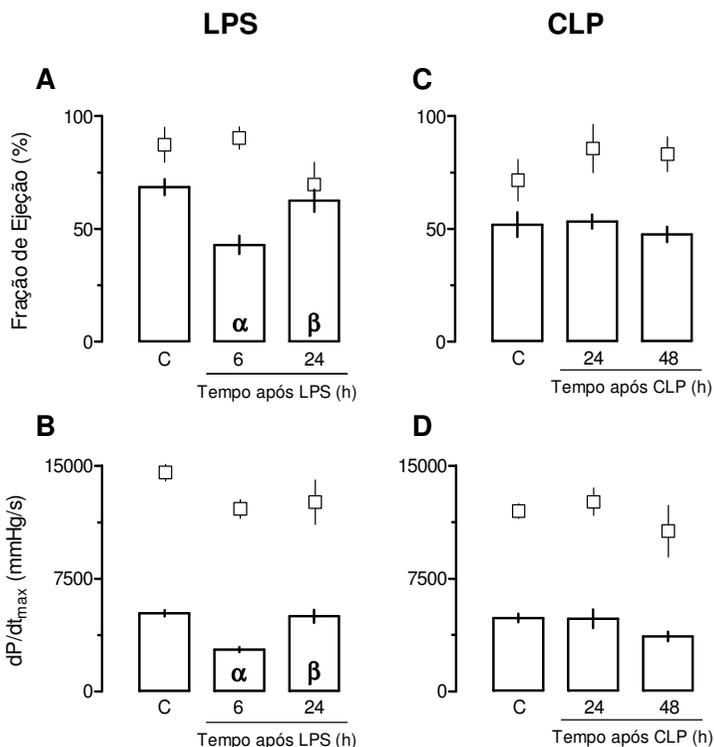


Figura 27: Fração de ejeção e dP/dt_{max} de ratos machos endotêmicos (LPS) ou sépticos (CLP) antes e após

administração de dobutamina. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 a 8 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados dos respectivos grupos controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a administração de dobutamina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α , β indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e LPS 6 h ou CLP 24 h, antes da administração de dobutamina (valores basais).

Na avaliação diastólica pelo índice dp/dt_{\min} , somente o grupo LPS 6 h apresentou redução do valor basal, porém sendo reestabelecido pela administração da dobutamina (Figura 28, A, representado pelas barras e quadrados abertos). Da mesma forma aumentos significativos nos demais grupos controle e LPS 24 h puderam ser observados, o que não ocorreu quando a dobutamina foi administrada nos animais submetidos à cirurgia de CLP (CLP 24 e 48 h) (Figura 28, A e C, representado pelos quadrados abertos, respectivamente). A administração de LPS ou cirurgia de CLP não alterou os valores basais do EDV (Figura 28, B e D, representado pelas barras, respectivamente). Curiosamente, entretanto, houve redução significativa do EDV nos animais do grupo LPS 6 h após a administração de dobutamina quando comparados aos demais grupos controle e LPS 24 h ou CLP 24 e 48 h (Figura 28, B e D, representado pelos quadrados abertos, respectivamente).

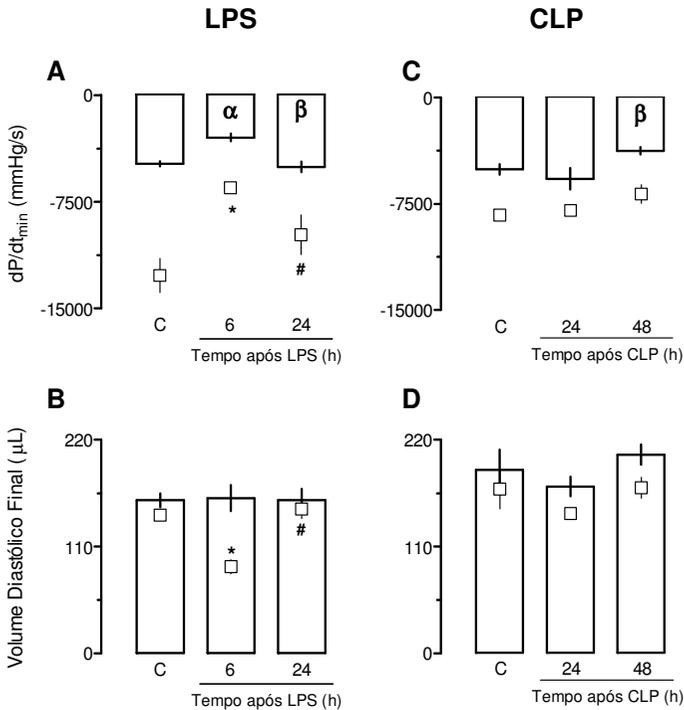


Figura 28: dP/dt_{\min} e volume diastólico final de ratos machos endotoxêmicos (LPS) ou sépticos (CLP) antes e após administração de dobutamina. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 a 8 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados dos respectivos grupos controle. A análise estatística foi feita separadamente (uma para os resultados basais e outra após a administração de dobutamina) sendo utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. α , β indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle e LPS 6 h ou CLP 24 h, antes da administração de dobutamina (valores basais).

4.3.2 Comparação da expressão das principais proteínas cardíacas responsáveis pelo tráfego do íon cálcio de acordo com diferentes modelos experimentais sepse

Para a avaliação da expressão das principais proteínas responsáveis pelo deslocamento do íon cálcio nos cardiomiócitos, todos os grupos de animais sépticos foram utilizados, ou seja, os grupos LPS 6 e 24 horas e os grupos CLP 24 e 48 horas, mesmo que apenas os animais 6 e 48 horas após o insulto séptico (modelos LPS e CLP, respectivamente) tenham apresentado hipotensão arterial.

A expressão do receptor de cálcio do retículo sarcoplasmático dependente de cálcio ou receptor de rianodina nos animais submetidos a injeção de LPS (ambos os grupos 6 e 24 horas após) se mostrou significativamente reduzida, ao passo que nos animais induzidos à sepse pela técnica de CLP, houve um aumento de sua expressão nos animais 48 horas após a cirurgia (Figura 29).

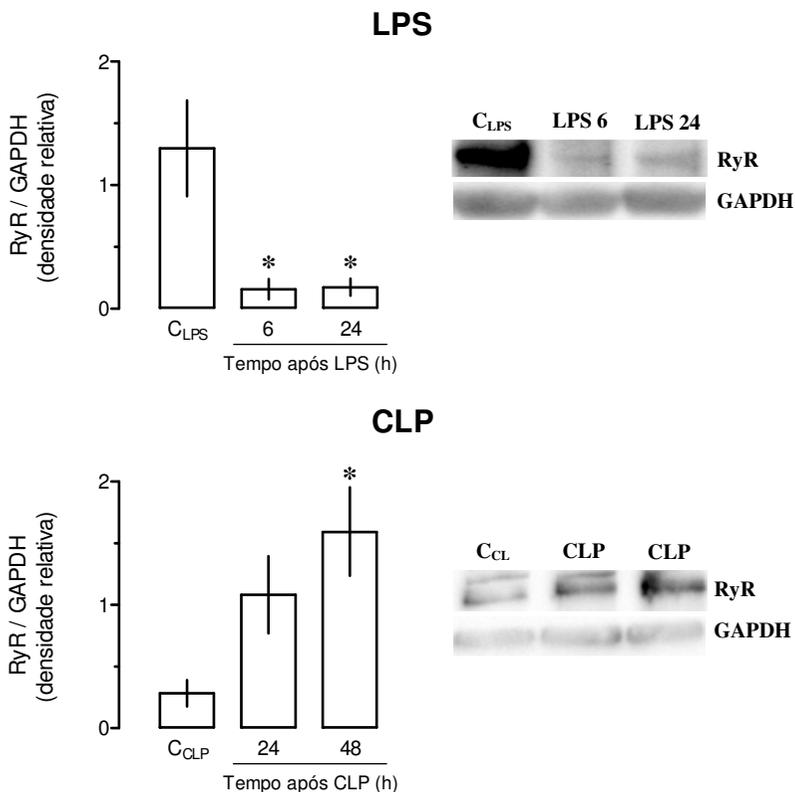


Figura 29: Expressão do receptor de rianodina em corações de ratos machos após administração de LPS e cirurgia de CLP. As barras representam a média \pm EPM de 3 a 4 animais por grupo. As letras “C_{LPS}” e “C_{CLP}” indicam os resultados dos grupos controle dos modelos de LPS e CLP, respectivamente. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

Assim como os receptores de rianodina, as proteínas transportadoras de cálcio do retículo sarcoplasmático dependentes de ATPase (SERCA) tiveram redução

estatisticamente significativa de sua expressão nos animais que receberam LPS, 6 e 24 horas após (Figura 30). Já os animais submetidos à cirurgia de CLP não apresentaram alterações na expressão da SERCA, 24 ou 48 horas após.

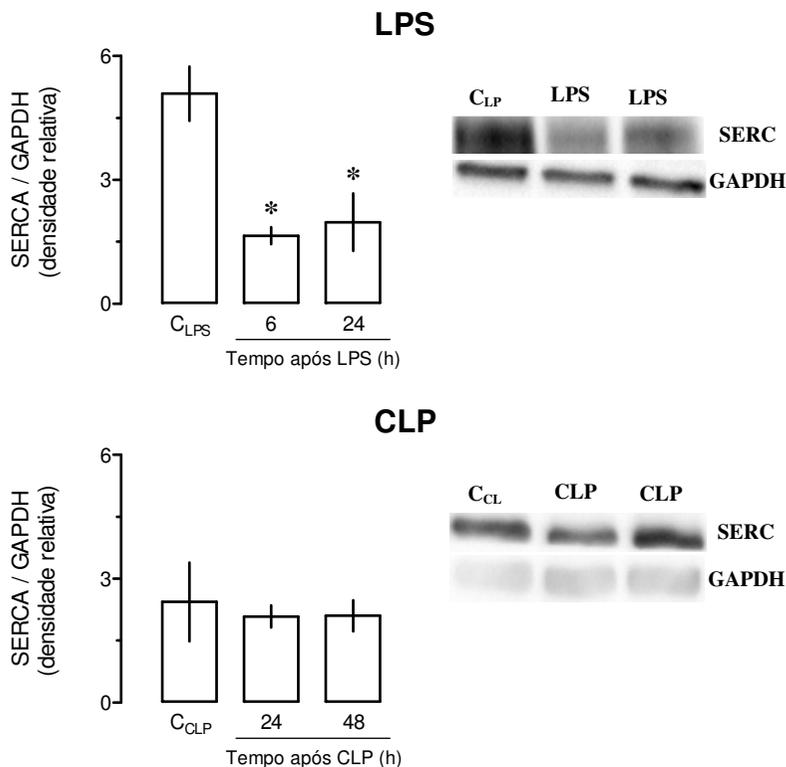


Figura 30: Expressão da SERCA em corações de ratos machos após administração de LPS e cirurgia de CLP. As barras representam a média \pm EPM de 3 a 4 animais por grupo. As letras “C_{LPS}” e “C_{CLP}” indicam os resultados dos grupos controle dos modelos de LPS e CLP, respectivamente. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle. SERCA:

transportador de cálcio do retículo sarcoplasmático dependente de ATPase.

Quando a expressão da pequena GTPase RhoA foi avaliada, pôde-se observar um aumento de sua expressão no ventrículo esquerdo somente dos animais CLP 48 horas, não havendo mudanças nos animais LPS, 6 ou 24 horas (Figura 31). As duas isoformas da enzima-alvo da RhoA, as Rhoquinasas (ROCKI e ROCKII) não apresentaram alterações de sua expressão em ambos os modelos experimentais, LPS ou CLP (dados não mostrados).

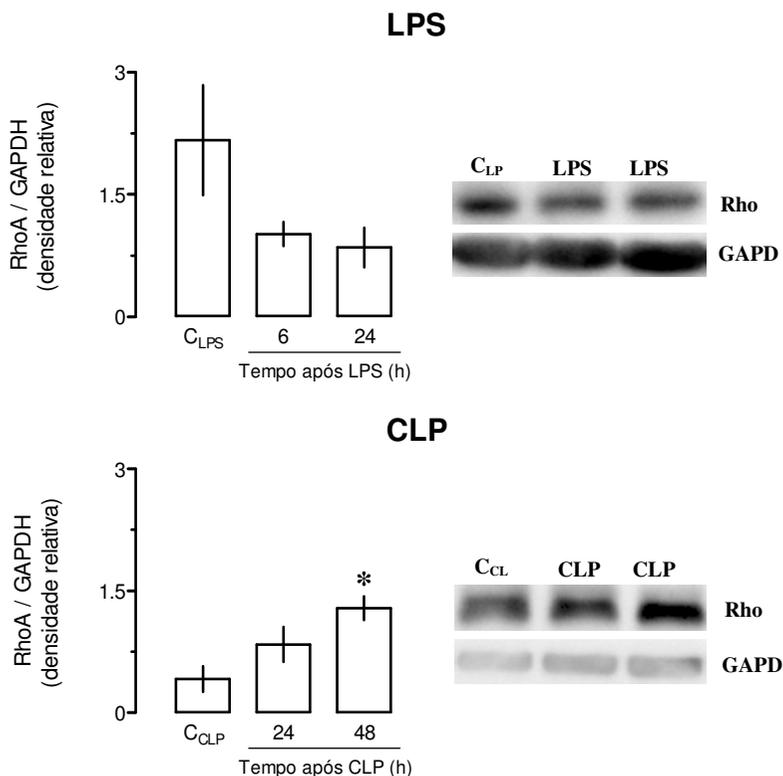


Figura 31: Expressão de RhoA em corações de ratos machos após administração de LPS e cirurgia de CLP. As

barras representam a média \pm EPM de 3 a 4 animais por grupo. As letras “C_{LPS}” e “C_{CLP}” indicam os resultados dos grupos controle dos modelos de LPS e CLP, respectivamente. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

Além do aumento da expressão do receptor de rianodina e da RhoA, animais do grupo CLP 48 horas, também apresentaram elevada expressão do receptor de trifosfato de inositol (IP3R). Não houve alteração de expressão do IP3R nos animais submetidos a aplicação de LPS (grupos LPS 6 e 24 horas) (Figura 32).

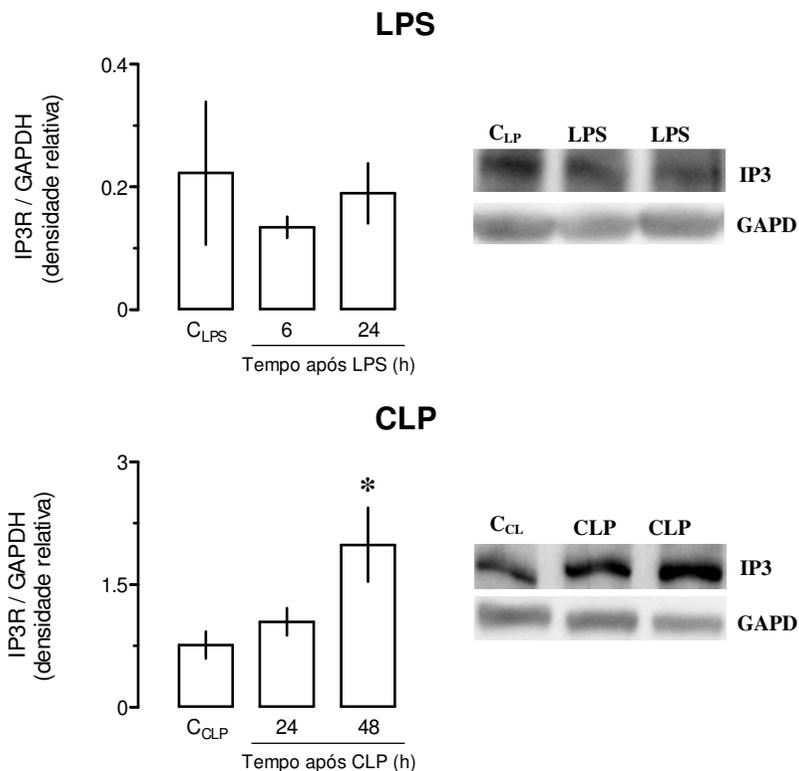


Figura 32: Expressão de IP3R em corações de ratos machos após administração de LPS e cirurgia de CLP. As barras representam a média \pm EPM de 3 a 4 animais por grupo. As letras “C_{LPS}” e “C_{CLP}” indicam os resultados dos grupos controle dos modelos de LPS e CLP, respectivamente. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle. IP3R: receptor de trifosfato de inositol.

5 DISCUSSÃO

5.1 PARTE 1: DIFERENÇAS NA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR LIGADAS AO GÊNERO EM RATOS ENDOTOXÊMICOS

A funcionalidade inadequada do sistema cardiovascular representa um ponto-chave durante o choque séptico. A incapacidade do sistema vascular de manter o tônus e responder adequadamente aos agentes vasoconstritores endógenos e exógenos é considerada uma das principais causas de hipotensão e hipoperfusão tecidual nesta condição. Também é aceito, entretanto, que a disfunção cardíaca *per se* possui papel crucial nas elevadas taxas de mortalidade entre os pacientes sépticos (PARKER et al., 1984). Embora homens e mulheres demonstrem claras diferenças no desenvolvimento, consequências e no prognóstico de doenças cardiovasculares, não observamos até o presente momento, para o nosso conhecimento, estudos experimentais voltados para a sepse ou choque endotoxêmico comparando as possíveis diferenças do perfil cardiovascular entre ratos machos e fêmeas. Estudos clínicos, desenvolvidos com o mesmo propósito, ainda se apresentam controversos ou inconclusivos (SCHRÖDER et al., 1998; ANGUS et al., 2001; HUBACEK et al., 2001).

Desta forma, por meio do cateter de condutância pressão-volume e cateterismo do ventrículo esquerdo com tórax fechado, avaliamos a existência de possíveis diferenças da funcionalidade cardíaca *in situ* relacionadas ao gênero de ratos submetidos ao choque endotóxico pela administração de LPS. Apesar das diferenças e limitações do modelo com relação ao choque séptico, especialmente quando

comparado com outros modelos de sepse, tais como a infecção polimicrobiana induzida pela ligadura e perfuração de ceco (CLP), é sabido que a administração de LPS simula uma série de aspectos da sepse severa e do choque séptico (DEJAGER et al., 2011).

Tanto os machos quanto as fêmeas, quando submetidos à administração de LPS, apresentaram hipotensão (Figura 11) e foram igualmente hiporreativos ao efeito vasopressor do fármaco fenilefrina (análise da área sob a curva e análise em anéis de aorta, vide Apêndice, itens 8.1 e 8.2). Hipotensão e refratariedade vascular à fármacos vasopressores são características bem conhecidas do choque séptico. Adicionalmente, pudemos observar que os animais de ambos os gêneros apresentaram redução da produção urinária (Figura 9), condição esta indicativa de desequilíbrio hemodinâmico e/ou disfunção renal durante a sepse. Em nosso estudo, fomos capazes de mostrar que ratos machos e fêmeas de ambos os grupos, LPS 6 e 24 horas, apresentaram granulocitose, linfopenia, monocitopenia, trombocitopenia severa, hipoglicemia, pH urinário reduzido, assim como valores elevados de nitrito e nitrato (NO_x) plasmáticos. Ainda, todos os animais (machos e fêmeas) do grupo LPS 6 h apresentaram hipotermia (antes da indução anestésica), a qual foi normalizada nos grupos LPS 24 h (Tabela 1). Resultados similares também já foram observados em seres humanos (MILLER et al., 1980; MITAKA et al., 2003; BAGSHAW et al., 2013; KUSHIMOTO et al., 2013; OSTROWSKI et al., 2013), confirmando que a administração de LPS induziu o estado de choque séptico próximo ao descrito em humanos nos nossos grupos experimentais. Juntos, esses resultados revelam

ausência de diferenças entre ratos machos e fêmeas com relação à avaliação geral do estado de choque endotóxico.

A primeira diferença observada entre ratos machos e fêmeas com endotoxemia foi a partir da avaliação da frequência cardíaca, do volume sistólico e débito cardíaco. Está bem descrito o aumento compensatório da frequência cardíaca em momentos iniciais da sepse (BARNABY et al., 2002), bem como que o débito cardíaco pode se apresentar inalterado ou acima dos valores fisiológicos em pacientes sépticos (PARKER et al., 1984). Um aumento da frequência cardíaca foi observado em todos os animais endotoxêmicos, machos e fêmeas, em ambos os grupos LPS 6 e 24 horas utilizados em nosso estudo (Figura 13, A e D) e, apesar da ausência de uma diferença significativa entre machos e fêmeas submetidos aos mesmos tratamentos (Tabela 4), o volume sistólico apresentou-se reduzido em ratos machos de ambos os grupos LPS 6 e 24 h, porém não sofreu alterações em fêmeas submetidas à aplicação de LPS. A associação entre a taquicardia pronunciada e a manutenção/ausência de alterações do volume sistólico pode explicar, pelo menos em parte, o débito cardíaco aumentado encontrado em fêmeas 24 horas após a aplicação do LPS, o qual não foi observado nos ratos machos do grupo LPS 24 h.

Apesar da observação de débitos cardíacos normais a aumentados, estudos experimentais e clínicos demonstram que a função cardíaca está frequentemente reduzida na sepse severa e no choque séptico (TAO et al., 2004; VIEILLARD-BARON et al., 2008). Uma redução na fração de ejeção, detectada por meio de exame ecocardiográfico, tem sido amplamente utilizada para avaliar o grau de disfunção cardíaca em pacientes sépticos (POELAERT et al., 1997). Nosso estudo

está de acordo com a literatura, pois demonstrou que 6 horas após a administração de LPS, ambos os animais, machos e fêmeas, apresentaram fração de ejeção reduzida, assim como redução dos índices derivada positiva da pressão intraventricular sobre o tempo (dP/dt_{max}) e pressão intraventricular em momento de dP/dt_{max} ($P@dP/dt_{max}$), acompanhados por redução no trabalho sistólico. Juntos, estes resultados indicam que os corações dos ratos machos e fêmeas durante os estágios iniciais do choque endotóxico apresentam uma incapacidade de gerar força e aumentar a pressão intraventricular. Entretanto, nossos resultados mostraram uma segunda diferença ligada ao gênero em ratos endotoxêmicos, pois o dP/dt_{max} , $P@dP/dt_{max}$ e o trabalho sistólico permaneceram reduzidos apenas nos ratos machos do grupo LPS 24 h, ao passo que voltaram à normalidade nas fêmeas do mesmo grupo (LPS 24 h) (Figura 14 e Tabela 5).

Embora o índice de avaliação do momento de contração isovolumétrica – dP/dt_{max} seja comumente utilizado como indicador de contratilidade miocárdica, é sabido que o mesmo é influenciado positivamente por mudanças ou aumentos da pré- e pós-carga (QUINONES; GAASCH; ALEXANDER, 1976). Desta maneira, a evidente redução observada em dP/dt_{max} e $P@dP/dt_{max}$ em machos e fêmeas do grupo LPS 6 h pode ser, pelo menos em parte, devida à reduzida pré- ou pós-carga, evidenciadas através do estado hipotensivo encontrado nestes animais. Com o intuito de explorar melhor o impacto do aumento da pós-carga nestes índices cardíacos, nós também avaliamos os mesmos parâmetros (dP/dt_{max} e $P@dP/dt_{max}$) durante o efeito hipertensor agudo pela administração de 30 nmol/kg (i.v) de fenilefrina, um vasopressor agonista adrenérgico seletivo para receptores α_1 , o qual não apresenta

efeitos inotrópicos positivos detectáveis. Ambos os índices dP/dt_{\max} e $P@dP/dt_{\max}$ apresentaram aumento semelhante (sem diferença no intervalo de aumento) em ratos machos e fêmeas dos grupos controle e LPS 6 h, mesmo que tenha sido observado hipotensão e uma reatividade reduzida ao efeito vasopressor da fenilefrina no estágio inicial da endotoxemia (Figura 11). Por outro lado, foi observado um aumento menor do $P@dP/dt_{\max}$ durante o efeito hipertensivo da fenilefrina em ratos machos do grupo LPS 24 h, mas não em fêmeas, quando comparados com o grupo controle. Salienta-se que nem os ratos machos tampouco as fêmeas apresentaram hipotensão arterial 24 horas após a aplicação do LPS, sugerindo que as reduções de dP/dt_{\max} e $P@dP/dt_{\max}$ encontradas nos ratos machos LPS 6 e 24 h e apenas nas fêmeas do grupo LPS 6 h não estavam relacionadas a diferenças na pré- ou pós-carga.

O cateter pressão volume utilizado em nosso estudo permite uma avaliação acurada de parâmetros sistólicos que são independentes do volume ventricular e da frequência cardíaca, tais como o índice PRSW (relação linear entre o trabalho sistólico ventricular esquerdo e o volume diastólico final), o qual tem sido utilizado e validado em estudos experimentais e clínicos (GLOWER et al., 1985; KASS et al., 1989; FENELY et al., 1992), bem como a relação dP/dt_{\max} -EDV, um outro índice de contratilidade do ventrículo esquerdo bem aceito (LITTLE, 1985). Nossos resultados demonstram uma redução significativa no PRSW e na relação dP/dt_{\max} -EDV tanto em ratos machos, quanto nas fêmeas do grupo LPS 6 h, confirmando que as reduções em dP/dt_{\max} , $P@dP/dt_{\max}$ e no trabalho sistólico, pelo menos no estágio inicial da sepse, pode ser explicado ao menos em parte por uma capacidade contrátil reduzida do ventrículo esquerdo, ao invés de ser

apenas devido a mudanças dependentes de volume ventricular ou da frequência cardíaca. Adicionalmente, a análise dos parâmetros independentes de volume demonstrou uma terceira diferença entre as funções dos corações de ratos machos e fêmeas, pois o PRSW permaneceu reduzido nos machos, mas não nas fêmeas (grupos LPS 24 h), sugerindo que ratos machos apresentam uma depressão contrátil ventricular mais sustentada durante o choque endotoxêmico.

Exceto pelo PRSW, não foram observadas diferenças nos resultados dos índices contráteis dP/dt_{\max} -EDV e ESPVR, o que não confirmaria, portanto, a presença de déficit contrátil miocárdico nos animais machos do grupo LPS 24 h, ou nos animais LPS 6 h. Entretanto, embora o índice dP/dt_{\max} -EDV seja considerado mais específico, o mesmo tem sido descrito como um índice menos reprodutível em comparação ao PRSW (FENELY et al., 1992). De fato, nós observamos uma linearidade reduzida na relação dP/dt_{\max} -EDV em nossos experimentos, enquanto houve alta linearidade para os valores do PRSW obtidos. Uma depressão transitória do índice PRSW já foi descrita em pacientes com choque séptico (PARKER et al., 1984), porém a mesma não foi reproduzida em nosso modelo de choque endotóxico em ratos, talvez devido a uma limitação deste modelo experimental ou pelo intervalo de tempo escolhido para as análises.

O impedimento do relaxamento miocárdico e a alteração da complacência da câmara cardíaca têm sido descritos durante o choque séptico, tanto em estudos clínicos e experimentais (CAVAZZONI et al., 2010; LANDESBURG et al., 2012). A utilização do cateter pressão-volume também nos permitiu comparar importantes índices cardíacos relacionados ao relaxamento ventricular entre ratos machos e fêmeas com

choque endotóxico. Apenas as fêmeas apresentaram redução significativa do dP/dt_{\min} durante a fase inicial da endotoxemia (grupo LPS 6 h), embora um valor de P de 0,057 tenha sido encontrado quando o resultado do dP/dt_{\min} do grupo LPS 6 h de ratos machos foi comparado ao seu respectivo grupo controle. Apesar da falta de uma diferença clara relacionada ao gênero a partir da comparação dos resultados do dP/dt_{\min} , uma quarta diferença encontrada em nossos estudos foi que somente as fêmeas do grupo LPS 6 h apresentaram um aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico – Tau, acrescido a uma tendência de aumento do volume diastólico final (EDV) em ambos os grupos LPS 6 e 24 horas (P = 0,064 e 0,069, respectivamente) e surgimento de aumento significativo do EDV no grupo LPS 24 h durante o efeito pressórico da fenilefrina (Figura 16). Tau pode ser considerado um índice de relaxamento ventricular independente de volume durante alterações discretas do volume intraventricular e ausência de mudanças na frequência cardíaca (STARLING et al., 1987), sendo, porém, sensível a aumentos da pré-carga; desta maneira, embora o aumento do Tau observado nas fêmeas em nossos experimentos possa sugerir uma disfunção diastólica mais intensa, nós não observamos alterações significativas na pressão diastólica final em nenhum dos grupos estudados (dados não mostrados), indicando que o aumento de Tau pode estar associado ao aumento do EDV. A significância exata da alteração do Tau, bem como as diferenças entre ratos machos e fêmeas com relação ao desenvolvimento de disfunção diastólica durante o choque endotóxico necessita de mais investigações.

Sendo assim, o conjunto dos resultados obtidos em corações intactos (*in situ*) de animais endotoxêmicos mostram

que ambos, ratos machos e fêmeas, apresentam uma contratilidade reduzida em estágios iniciais (grupo LPS 6 h) da endotoxemia, bem como mostram a existência de diferenças ligadas ao gênero em estágios tardios do choque endotóxico. Somente ratos machos apresentaram uma significativa redução da função sistólica 24 horas após a administração de LPS. Corroborando esta conclusão, nossos resultados também demonstraram um aumento nos volumes sistólicos finais (residuais) em ambos os gêneros do grupo LPS 6 h, o qual voltou à normalidade somente nas fêmeas do grupo LPS 24 h (Figura 17, A e C), apesar do aumento do volume diastólico final nas mesmas (aumentos esses que não induziram edema pulmonar; vide Apêndice, item 8.3). Durante o efeito vasopressórico da fenilefrina, entretanto, as fêmeas do grupo LPS 24 h apresentaram um aumento significativo tanto no volume residual, quanto no diastólico final, quando comparadas aos machos com endotoxemia (Figura 16, C e F, círculos; Figura 17, B e D). Esses achados podem ser um indicador de que a função cardíaca das fêmeas 24 horas após a aplicação do LPS não estava completamente reestabelecida. Uma análise mais rigorosa de nossos dados, todavia, demonstrou que as fêmeas do grupo controle tiveram um valor do volume diastólico final significativamente menor quando comparadas aos machos do mesmo grupo (Tabela 6). Além disso, seguindo a tendência observada entre os grupos controle (sem a utilização de fenilefrina), verifica-se que as fêmeas do grupo LPS 24 h também apresentaram redução dos valores do volume sistólico final (Tabela 7). Levando-se em consideração que os valores máximos encontrados de volume intraventricular ao final da sístole e diástole durante os efeitos pressóricos e de retorno venoso da fenilefrina não diferiram

entre ratos machos e fêmeas (Tabela 6), assim como o volume sistólico das fêmeas do grupo LPS 24 h não sofreu alterações significativas (Figura 13E), é possível sugerir que o aumento do volume sistólico final observado somente nas fêmeas do grupo LPS 24 h, pode estar associado com uma resposta ventricular esquerda mais adequada aos efeitos induzidos pela fenilefrina.

Apesar de estudos prévios sugerirem que o ciclo hormonal das fêmeas poderia explicar as diferenças relacionadas ao gênero observadas na resposta inflamatória e função cardíaca após indução de queimaduras em ratos (HORTON; WHITE; MAASS, 2004), o papel dos hormônios sexuais na função cardíaca durante a endotoxemia não foi avaliada em nosso trabalho e merece maiores investigações por meio de métodos acurados de dosagem hormonal (WEIXELBAUMER et al., 2014). Outro ponto a ser considerado na interpretação de nossos resultados decorre da diferenciação entre os pesos dos ratos machos e fêmeas (de mesma idade) refletindo no tamanho de seus corações, volume sistêmico e intraventricular, bem como a força de contração desenvolvida pelo ventrículo esquerdo. Tais aspectos devem ser considerados principalmente quando as diferenças de gênero são avaliadas em ratos sujeitos ao mesmo grupo experimental, ou seja, controle, LPS 6 e 24 horas.

Finalmente, esta parte do nosso estudo não visou a comparação entre os efeitos de diferentes drogas com ação sobre o coração. Com a análise de nossos resultados, porém, é possível especular que se as diferenças observadas entre ratos machos e fêmeas submetidos ao choque endotóxico forem aplicáveis aos humanos com choque séptico, a necessidade de melhorar a funcionalidade cardíaca, atrelada à utilização de

fármacos vasoativos e cardiotônicos, podem apresentar particularidades ligadas ao gênero que têm sido negligenciadas na prática clínica ao longo dos anos. Avaliações da expressão de proteínas cardíacas responsáveis pelo deslocamento do íon cálcio reforçam essa teoria, pois igualmente demonstram diferenças entre ratos machos e fêmeas com endotoxemia, possivelmente favorecendo alterações funcionais distintas (vide Apêndice, item 8.4).

Observamos uma redução significativa da expressão dos receptores de rianodina somente em machos endotoxêmicos (vide Apêndice, item 8.4, Figura 35) o que sabidamente contribui para uma reduzida capacidade contrátil miocárdica (WU & LIU, 1992). Por outro lado a expressão da pequena GTPase RhoA apresentou-se reduzida apenas nas fêmeas (vide Apêndice, item 8.4, Figura 37). Distintos papéis têm sido atribuídos à RhoA na fisiologia cardiovascular e possíveis alterações desta proteína em patologias cardiovasculares. Mais estudos, entretanto, são necessários para um melhor entendimento de como a alteração de expressão desta proteína contribuiria para disfunções cardíacas durante a sepse (LOIRAND; GUÉRIN; PACAUD, 2006). Reduções significativas e ausência de alterações nas expressões das proteínas SERCA e fosfolambana (forma não-fosforilada e fosforilada) foram observadas, respectivamente, nos animais LPS 6 e 24 h de ambos os gêneros (vide Apêndice, item 8.4, Figuras 36, 38 e 39), o que contrasta com resultados da literatura, embora estes sejam incipientes, e realizados somente em machos (HOBBI et al., 2013).

5.2 PERFIL DE RESPOSTA CARDIOVASCULAR À CATECOLAMINAS EM RATOS MACHOS COM CHOQUE SÉPTICO

Na primeira parte de nosso trabalho, demonstramos que ratos machos com endotoxemia apresentaram distúrbio cardíaco sustentado, quando comparado às fêmeas. Tais resultados suscitaram o interesse pela avaliação da função cardiovascular em machos a partir do modelo polimicrobiano de sepse (CLP), atualmente considerado o modelo que mais se aproxima da sepse humana (REMICK; WARD, 2005; RITTIRSCH et., 2009). Adicionalmente, observamos que persiste incerto na literatura: i) quais são as principais alterações funcionais cardiovasculares em ratos submetidos à cirurgia de CLP, e principalmente, ii) qual é o perfil da resposta cardíaca sob análise dinâmica *in situ*, frente à administração das principais catecolaminas, noradrenalina (vasopressora) e dobutamina (inotrópica), utilizadas para tratamento do choque séptico em ambiente hospitalar.

Baseados na curva de sobrevivência que obtivemos (Figura 18), a qual determinou 50% de mortes dos animais a partir de 48 horas após a realização da cirurgia de CLP, escolhemos os tempos de 24 e 48 horas (grupos CLP 24 e 48 h) para as análises subseqüentes. Pudemos demonstrar pela análise hematológica, que ambos os grupos CLP 24 e 48 h apresentaram linfopenia, trombocitopenia e hipoglicemia (Tabela 8). Somente os animais do grupo CLP 24 h apresentaram redução do número de leucócitos quando comparados ao grupo controle. Embora diferenças significativas na contagem de monócitos e granulócitos entre os grupos (controle, CLP 24 e 48 h) não tenham sido

observadas, é possível notar um aumento tempo-dependente destas células nestes animais, especialmente do número de granulócitos (Tabela 8), o qual possivelmente contribuiu para a falta de diferença da leucometria no grupo CLP 48 h. Sendo assim, os resultados hematológicos demonstram alterações similares nos ratos quando comparadas àquelas observadas em seres humanos sépticos, sendo compatíveis com o quadro de sepse severa (MILLER et al., 1980; INOUE, et al., 2013; OSTROWSKI et al., 2013). Ainda, a ausência de diferenças significativas entre os hematócritos dos grupos estudados (controle, CLP 24 e 48 h) sugere um estado volêmico normal quando as avaliações cardiovasculares *in situ* foram realizadas, excluindo alterações cardiovasculares decorrentes de mudanças do volume sanguíneo circulante.

Somente os ratos do grupo CLP 48 h apresentaram hipotensão arterial (Figura 19). Juntos, esses resultados demonstram que a cirurgia de CLP utilizada em nosso estudo foi capaz de induzir um estado semelhante ao choque séptico em ratos. A partir desta observação, realizamos administrações intravenosas de doses crescentes dos principais fármacos com ação vasopressora (noradrenalina), e inotrópica positiva (dobutamina), atualmente utilizados em humanos para o tratamento do choque séptico (DELLINGER et al., 2013). Nossos resultados demonstraram que doses de 1 e 30 nmol/kg de noradrenalina e dobutamina, respectivamente, foram capazes de corrigir a hipotensão dos ratos com choque séptico induzido pela cirurgia de CLP (grupo CLP 48 h).

Embora sob elevada indicação de uso na rotina de tratamento do paciente séptico com hipotensão, estudos observacionais multicêntricos em humanos ainda não conseguiram até o presente momento apontar para

determinado(s) fármaco(s) vasopressor(es) ou inotrópico(s) que aumentem a sobrevivência dos pacientes sob tratamento com essas drogas (HERNANDEZ, et al., 2005; SAKR, et al., 2006; VASU, et al., 2012). Adicionalmente, são escassos os estudos que descrevem os efeitos destas drogas na função cardíaca de ratos com choque séptico avaliados por meio de método invasivo. A avaliação em tempo real da dinâmica cardíaca em ratos sépticos antes e após a administração de catecolaminas, possivelmente contribuía para o entendimento do motivo dessas drogas, apesar de corrigirem a pressão arterial do paciente com choque séptico, não serem capazes de aumentar a sobrevida dos pacientes humanos.

O grupo CLP 48 h apresentou uma redução significativa da frequência cardíaca quando comparados aos animais do grupo CLP 24 h, a qual, juntamente com a hipotensão arterial, sugere a presença de fase hipodinâmica da sepse nestes animais (Figura 2A, representado pelas barras) (FLYNN; CHOKKALINGAM MANI; MATHER, 2010). Reduções no débito cardíaco são um achado comum da fase hipodinâmica cardiovascular em pacientes sépticos, embora já tenha sido descrita a presença de valores normais à aumentados do débito cardíaco, a despeito da presença de hipotensão arterial ou reduzida frequência cardíaca (ZHOU, WANG, CHAUDRY, 1998; TAO et al., 2004). Em nosso estudo, não foram observadas alterações significativas do débito cardíaco ou volume sistólico nos grupos estudados (CLP 24 ou 48 h) (Figura 21, C e F, B e E, respectivamente). A administração de noradrenalina não alterou o perfil da frequência cardíaca dos grupos CLP 48 h, embora tenha induzido taquicardia no grupo CLP 24 h quando comparado ao grupo controle (Figura 21A, representado pelas barras e

triângulos abertos). Martin e colaboradores (1999), já haviam demonstrado ausência de alteração na frequência cardíaca pela administração de noradrenalina em pacientes com choque séptico, apesar da correção da hipotensão.

Por sua vez, a administração da dobutamina elevou a frequência cardíaca de todos os grupos (controle, CLP 24 e 48 h), inclusive normalizando a frequência cardíaca do grupo CLP 48 h se comparada aos valores basais (antes da administração da dobutamina) obtidos do grupo controle (Figura 21D, representado pelas barras e quadrados abertos). Embora a fase hipodinâmica do distúrbio cardiovascular induzido pela sepse seja reconhecida como causadora de maior mortalidade (YANG et al., 1999), trabalhos recentes também demonstram que pacientes sépticos taquicárdicos (em fase hiperdinâmica) apresentam maiores taxas de mortalidade (SCHMITTINGER et al., 2012). Apesar da correção da hipotensão, o aumento da frequência cardíaca induzida pela dobutamina, suscita questionamentos quanto ao seu emprego diante da contradição, ainda presente na rotina da pesquisa e tratamento de pacientes sépticos (JELLEMA et al., 2006). Considerando-se que ambas as drogas foram capazes de corrigir a pressão arterial nas respectivas doses, de 1 nmol e 30 nmol/kg (para noradrenalina e dobutamina, respectivamente) e que a noradrenalina não determinou alterações da frequência cardíaca no grupo com choque séptico (CLP 48 h), parece-nos que este representaria um ponto inicial a ser considerado na escolha da catecolamina para a correção da hipotensão durante o choque séptico.

A cirurgia de CLP utilizada em nossos experimentos não foi capaz, pelo menos nos tempos analisados (24 e 48 h após a cirurgia), de induzir alterações nos índices cardíacos fração de ejeção, dP/dt_{max} , e trabalho sistólico (Figura 22, A e

E, B e F, D e H, representado pelas barras) sugerindo ausência de disfunção cardíaca, a despeito da caracterização do choque séptico nos animais do grupo CLP 48 h. Isso foi reforçado pela análise dos parâmetros contráteis independentes de volume PRSW, dP/dt_{\max} -EDV e ESPVR (Figura 23, A-C), considerados mais acurados para este tipo de análise. Apesar da disfunção miocárdica induzida pela MIS ser considerada um importante fator preditor de mortalidade quando diagnosticada, está bem descrito na literatura que sua incidência é de aproximadamente 40% em pacientes com choque séptico (KUMAR et al., 2011).

Considerando a existência de hipotensão arterial acrescida à ausência de déficit contrátil cardíaco, observamos que a administração de noradrenalina não alterou significativamente o volume sistólico e débito cardíaco, enquanto a dobutamina, provavelmente pela sua ação essencialmente β_1 -adrenérgica, determinou elevações destes parâmetros cardíacos nos grupos CLP 48 h (Figura 21, B e E, C e F, representado pelos triângulos e quadrados abertos, respectivamente). De fato, também houve um aumento, embora discreto, na fração de ejeção e nos índices dP/dt_{\max} e trabalho sistólico após o uso da dobutamina, quando comparados com os valores obtidos após a administração da noradrenalina, (Figura 22, E, F e H, representado pelos quadrados abertos). Desta forma, fica evidente que a correção da hipotensão arterial dos ratos sépticos (grupo CLP 48 h) se deu, em parte, através de um maior trabalho cardíaco induzido pela ação inotrópica da dobutamina, quando comparado aos resultados obtidos com a noradrenalina.

Apenas o índice de avaliação da pressão intraventricular em momento de contração isovolumétrica –

$P@dP/dt_{max}$ apresentou redução significativa nos animais do grupo CLP 48 h (Figura 22C, representado pelas barras), possivelmente em virtude da influência da pressão arterial sistêmica sobre o mesmo (QUINONES; GAASCH; ALEXANDER, 1976). Mesmo com a administração de 30 nmol/kg de dobutamina, o valor de $P@dP/dt_{max}$ permaneceu reduzido no grupo CLP 48 h quando comparado ao grupo controle (Figura 22G, representado pelos quadrados abertos). Acreditamos que isso ocorreu devido a menor capacidade, embora discreta, que a dobutamina teve de aumentar a pós-carga (avaliada através da elastância arterial; dados não mostrados) quando comparada à noradrenalina, apesar de ambas as drogas terem corrigido a hipotensão (Figura 20, A e B).

A avaliação de parâmetros diastólicos como dP/dt_{min} e Tau também não revelou alterações nos animais submetidos à cirurgia de CLP, apesar da redução do dP/dt_{min} no grupo CLP 48 h quando comparado aos animais do grupo CLP 24h (Figura 24, A e D, representado pelas barras). Ao observarmos as reduções nas pressões arteriais sistólica e diastólica do grupo CLP 48 h em comparação ao grupo controle ($99,6 \pm 2,4$ vs $81,8 \pm 2,4$ e $66,8 \pm 2,8$ vs $48,1 \pm 1,4$ mmHg, respectivamente) (Figura 19, A e B), é possível perceber uma queda mais acentuada na pressão arterial diastólica, favorecendo o resultado do índice dP/dt_{min} reduzido nestes animais. A ausência de diferenças significativas em dP/dt_{min} entre os grupos controle, CLP 24 e 48 h após as administrações de noradrenalina e dobutamina, as quais corrigiram a pressão arterial, reforça este raciocínio. Da mesma forma, a utilização destes fármacos não induziu respostas discrepantes no índice Tau nos diferentes grupos estudados (Figura 24, B e E,

representado pelos triângulos e quadrados abertos). A cirurgia de CLP não induziu alterações no volume diastólico final entre os grupos controle, CLP 24 e 48 h analisados, assim como o perfil de resposta cardíaca às administrações do vasopressor-noradrenalina e inotrópico positivo-dobutamina não divergiu entre os animais (Figura 24, C e F, representado pelas barras, triângulos e quadrados abertos, respectivamente). Discretas reduções no volume diastólico final nos animais dos grupos CLP 24 e 48 h após a administração da dobutamina puderam ser observados (Figura 24F, representado pelos quadrados abertos), provavelmente em virtude também da ação inotrópica positiva, que pode ser verificada pelo aumento na fração de ejeção dos mesmos grupos (Figura 22E).

Independentemente da ausência do distúrbio cardíaco nos ratos submetidos a cirurgia de CLP em nossos experimentos, a sepse severa e o choque séptico foram caracterizados, sendo representados pelas alterações hematológicas (trombocitopenia e hipoglicemia por exemplo) e hipotensão arterial, respectivamente. Ainda, o choque séptico observado nos ratos do grupo CLP 48 h induziu uma taxa de mortalidade similar àquela descrita em humanos (50%) (MAYR; YENDE; ANGUS, 2014). Estudos da eficácia do tratamento clínico do choque séptico (medida em sobrevida dos pacientes) demonstram a constância de uso de fármacos vasopressores e inotrópicos, utilizados de maneira isolada ou mesmo em associação, porém os quais ainda não são capazes de aumentar a sobrevida dos pacientes (SAKR et al., 2006). Atualmente, a medida da pressão arterial é utilizada como referência para o diagnóstico e tratamento da disfunção cardiovascular do paciente séptico, sem a devida investigação de uma possível disfunção cardíaca concomitante (de

AZEVEDO et al., 2014). Já é bem descrito, entretanto, que o surgimento de alterações cardíacas induzidas pela MIS é fator agravante dos índices de mortalidade (VINCENT et al., 2006). Acrescido à inconstância de avaliação cardíaca *per se* no cenário do paciente com choque séptico, as implicações funcionais cardíacas pelas administrações de fármacos com ação sobre o sistema cardiovascular utilizados para o seu tratamento ainda são escassas, especialmente em animais de laboratório (CHOPRA et al., 2010).

Desta forma, nosso estudo conseguiu demonstrar que ambas as drogas utilizadas, tendo uma ação preferencialmente vasopressora e outra inotrópica, foram igualmente capazes de corrigir a hipotensão arterial do grupo de ratos com choque séptico (CLP 48 h). Entretanto, a correção da pressão arterial nos animais do grupo CLP 48 h pela administração de dobutamina ocorreu às custas de um aumento da frequência cardíaca e de índices sistólicos como fração de ejeção, dP/dt_{max} e trabalho sistólico, o que poderia favorecer maiores taxas de mortalidade, segundo a literatura (SINGER et al., 2013). Ainda, Bai e colaboradores (2014), demonstram uma redução da taxa de mortalidade de pacientes com choque séptico quando a hipotensão foi corrigida precocemente por administração de noradrenalina. Estudos adicionais com tratamentos crônicos (infusões contínuas) destas drogas em ratos, ainda se fazem necessários para essa avaliação. Através de nossos resultados, porém, pudemos demonstrar que diferentes fármacos com ação sobre o sistema cardiovascular são capazes de tratar a hipotensão em ratos sépticos, porém induzindo diferentes respostas cardíacas, as quais sabidamente algumas delas são potencialmente deletérias a longo prazo.

5.3 PARTE 3: DIFERENTES RESPOSTAS CARDÍACAS AO TRATAMENTO COM DOBUTAMINA DE ACORDO COM O MODELO DE SEPSE E CORRELAÇÃO COM ALTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS DO TRÁFEGO DO ÍON CÁLCIO

Historicamente, distintos modelos animais de indução de sepse foram desenvolvidos com a intenção de tentar elucidar esta complexa síndrome clínica (WICHTERMAN et al., 1980). No mesmo período em que os modelos experimentais começaram a ser desenvolvidos (década de 80), Parker e colaboradores (1984) conseguiram pela primeira vez comprovar a existência de disfunção miocárdica induzida pela sepse (PARKER et al, 1984; RABUEL, MEBAZAA, 2006). Com o passar dos anos e diversos trabalhos publicados, entretanto, permanece obscura a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos por de trás da MIS, bem como sob discussão qual(is) modelo(s) experimental(is) representaria(m) adequadamente o modelo de estudo para a sepse ou MIS (ZAKY et al., 2014).

Conforme demonstramos anteriormente, os modelos de sepse utilizados nesse estudo (LPS e CLP) sabidamente induziram o quadro de sepse severa nos ratos estudados (vide em Resultados, itens 4.1.1 e 4.2.2, respectivamente). Ainda, nossos resultados, através da avaliação da pressão arterial sistólica dos animais submetidos à sepse, demonstraram que ambos os grupos (LPS 6 h e CLP 48 h) desenvolveram uma hipotensão arterial bastante semelhante ($88 \pm 2,2$ e $81,8 \pm 2,4$ mmHg, respectivamente), embora tenham sido em tempos diferentes (Figura 25, A e B, respectivamente, representado pelas barras). O surgimento de hipotensão arterial em horários

destoantes após a aplicação do LPS ou da cirurgia de CLP está de acordo com o descrito na literatura, uma vez que a endotoxemia sabidamente representa um modelo de choque agudo, enquanto o modelo de CLP desencadeia a fase hipodinâmica cardiovascular em estágios tardios pós-indução da sepse (HUBBARD et al., 2005).

Sendo assim, comparamos por avaliação cardíaca *in situ*, os dois modelos mais empregados na rotina de experimentação animal a partir da correção da pressão arterial, às custas de um desafio inotrópico desencadeado pelo uso da dobutamina. A dobutamina, representa a principal droga, com característica inotrópica positiva, utilizada na rotina hospitalar de tratamento do paciente com choque séptico e sob diagnóstico ou suspeita de MIS (DELLINGER et al., 2013). Adicionalmente, investigamos o perfil de expressão das principais proteínas responsáveis pela cinética do íon cálcio no coração nos dois modelos, e sua provável influência sobre os perfis cardiovasculares apresentados. Ainda sob ausência de consenso, alguns autores descrevem as alterações quantitativas de proteínas transportadoras de cálcio no cardiomiócito como responsáveis pelas disfunções cardíacas durante a MIS (DONG et al., 2001; YIN et al., 2006; CROFT et al., 2007). Porém, a investigação da relação entre a expressão destas proteínas e o perfil de resposta cardíaca à dobutamina, de acordo com o modelo de sepse utilizado, permanece pouco conhecida.

A administração de 30 nmol/kg de dobutamina por via intravenosa corrigiu a pressão arterial dos grupos de animais hipotensos LPS 6 h e CLP 48 h de maneira semelhante (Figura 25, A e B, representado pelos quadrados abertos). Ambos os grupos controle, LPS e CLP 24 h também apresentaram respostas semelhantes à dobutamina, apesar de um aumento

mais significativo da pressão arterial nos animais controle e LPS 24 h quando comparado aos animais do modelo de CLP (Figura 25, A e B, representado pelos quadrados abertos).

Apesar da caracterização de um perfil de hipotensão e correção de pressão arterial pela administração de dobutamina semelhante entre os modelos de LPS e CLP, perfis diferentes de alteração na frequência cardíaca foram observados. O modelo LPS determinou uma taquicardia sustentada em ambos os grupos LPS 6 e 24 h, ao passo que a cirurgia de CLP determinou redução da frequência nos animais do grupo CLP 48 h (Figura 26, A e C, respectivamente, representado pelas barras). O aumento da frequência cardíaca está bem descrita em fases iniciais ou agudas da sepse, conforme representado pelo modelo de LPS (BARNABY et al., 2002), ao passo que Cavazzoni e colaboradores (2010), demonstram a redução da frequência cardíaca em animais submetidos à sepse pelo modelo de CLP, indicando fases tardias ou de hipodinamismo cardíaco.

Curiosamente, os valores finais da frequência cardíaca foram semelhantes entre os modelos LPS e CLP após a administração da dobutamina, porém observamos uma resposta cardíaca reduzida nos grupos LPS 6 e 24 h, quando comparados aos animais CLP 48 e 24 h, respectivamente (ou seja, uma comparação entre os animais hipotensos e não-hipotensos) (Figura 26, A e C, representado pelos quadrados abertos). A expressão reduzida da proteína SERCA, observada em nossos experimentos somente nos animais submetidos ao modelo de LPS (Figura 30), atrelada à frequência cardíaca basal elevada deste mesmo grupo experimental, parece influenciar a menor capacidade da dobutamina em aumentar a frequência cardíaca (JOULIN et al., 2008).

A diferença observada na frequência cardíaca basal entre os modelos LPS e CLP, não influenciou os resultados dos débitos cardíacos dos animais (Figura 26, B e D, representado pelas barras), porém, o desafio inotrópico com a dobutamina evidenciou um perfil diferente de resposta entre os modelos estudados. Os animais submetidos a aplicação de LPS tiveram discreta elevação (grupo LPS 6 h) ou ausência de mudança (grupo LPS 24 h) no débito cardíaco, enquanto animais dos grupos CLP 24 e 48 h apresentaram aumentos significativos nos seus débitos, o que reforça a possibilidade de uma resposta reduzida à dobutamina nos animais endotoxêmicos (Figura 26, B e D, representado pelos quadrados abertos). Este perfil foi mantido apenas nos animais LPS 24 h quando avaliou-se a fração de ejeção, pois também houve resposta diminuída à ação inotrópica da dobutamina (Figura 27, A e B, representado pelas barras e quadrados abertos). Apesar da redução do dP/dt_{max} apenas nos animais LPS 6 h em comparação aos demais grupos (LPS e CLP), o que sugere um déficit contrátil do miocárdio, não houve diferenças de respostas à administração de dobutamina entre os grupos (Figura 27, B e D, representado pelas barras e quadrados abertos). Considerando que o dP/dt_{max} é um índice que sofre influências especialmente da pré-carga, e em baixo grau da pós-carga, acreditamos que essa ausência de diferença no dP/dt_{max} entre grupos de animais dos modelos LPS e CLP seja, portanto, devido à ausência de alterações do estado volêmico dos animais (caracterizado em resultados anteriores) acrescido da normalização da pressão arterial, após a administração da dobutamina (LIONETTI et al., 2013).

Em experimentos anteriores mostramos que o modelo de LPS induziu uma redução da capacidade contrátil

ventricular dos animais pela análise de parâmetros independentes do volume intraventricular em ambos os momentos analisados (LPS 6 e 24 h) enquanto o mesmo não ocorreu com os animais submetidos à cirurgia de CLP (vide Figuras 15 e 23, respectivamente). Quando avaliamos a expressão do receptor de rianodina, responsável pela liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático e, portanto, envolvido na contração do músculo cardíaco, uma redução significativa em ambos os grupos LPS 6 e 24 h foi observada. Animais submetidos à cirurgia de CLP, no entanto, apresentaram um aumento tempo-dependente da expressão do receptor rianodina, justificando, pelo menos em parte, as diferenças encontradas em nosso estudo (Figura 29). Embora a literatura acerca deste assunto ainda seja escassa, relações diretas entre a redução de receptores de rianodina com o surgimento de disfunção muscular contrátil já foram demonstradas (JIAO et al., 2013).

Adicionalmente, observamos que somente os animais do grupo CLP 48 h apresentaram aumentos de expressão de RhoA e do receptor de IP3 (Figuras 31 e 32). Segundo Shi & Wei (2013), aumentos da atividade da via das Rho quinases podem contribuir para o aumento da sinalização de apoptose de cardiomiócitos, ou mesmo estimular proliferação celular desencadeando hipertrofia miocárdica. Desconhecemos estudos que avaliem a expressão e os efeitos na contratilidade cardíaca da mudança de expressão da via da RhoA no decorrer da sepse. Desta forma, nossos resultados permitem especular que há uma possível contribuição do aumento da expressão da RhoA para a ausência de alterações cardíacas nos animais do grupo CLP 48 h. A inexistência de alterações nas expressões das quinases da via da Rho (ROCK I e ROCK II), entretanto,

representa outro fator a ser considerado na análise do resultado do aumento de expressão de RhoA e suas possíveis implicações funcionais nos animais sépticos. Peng e colaboradores (2008) demonstraram que a via de sinalização IP3/IP3R contribui para a disfunção miocárdica durante a sepse. Porém, permanece para ser esclarecida se a ativação da via da fosfolipase C de fato é indutora ou representa um fator protetor para o desenvolvimento da MIS. Outro estudo mostra, por exemplo, que a hipertrofia miocárdica induzida por noradrenalina, substância sabidamente liberada no organismo em altas concentrações durante a sepse, é possivelmente desencadeada a partir da ativação da via da fosfolipase C e IP3/IP3R (SINGAL; DHALA; TAPPIA, 2004). Apesar da dobutamina, utilizada neste estudo, atuar principalmente nos receptores β_1 -adrenérgicos, sua ligação com receptores α_1 também é descrita, a qual também desencadeia ativação da via de sinalização da fosfolipase C (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006). Desta forma, apesar do papel das vias da Rho quinase e IP3/IP3R sobre a funcionalidade cardíaca durante a sepse permanecer por ser esclarecido, nossos resultados demonstram que, ao contrário dos animais com choque endotóxico (modelo de LPS), os animais com choque séptico induzido pelo modelo de CLP não apresentaram distúrbios contráteis do miocárdio (ao menos nos tempos avaliados), e que esta diferença funcional esteve associada aos aumentos das expressões de RhoA e IP3R, bem como do receptor de rianodina.

A administração de dobutamina não foi capaz de igualar os valores do índice diastólico dP/dt_{\min} nos animais submetidos à aplicação de LPS, o que ocorreu com os animais com choque séptico (modelo CLP). Proporcionalmente,

entretanto, a resposta à dobutamina foi maior nos animais do grupo LPS 24 h, se comparado ao CLP 24 h (Figura 28, A e B, representado pelas barras e quadrados abertos). Embora reduções da expressão da proteína SERCA, as quais foram observadas no miocárdio de animais dos grupos LPS 6 e 24 h, determinem alterações da capacidade de relaxamento do miocárdio e poderiam ter induzido os resultados observados no grupo LPS 6 h, não podemos explicar porque os animais do grupo LPS 24 h não apresentaram igual redução do índice dP/dt_{\min} , ou mesmo uma resposta maior à administração da dobutamina (JOULIN et al., 2008).

Enquanto os valores basais do volume diastólico final (EDV) não sofreram nenhuma alteração nos animais LPS ou CLP (Figura 28, B e D, representado pelas barras), a administração da dobutamina determinou alterações do EDV (reduções acentuadas no grupo LPS 6 h e discretas nos grupos CLP 24 e 48 h), as quais reforçam a importância do valor da frequência cardíaca de acordo com o modelo experimental, bem como a capacidade de resposta cardíaca frente ao uso da própria dobutamina. A comparação do valor do EDV dos animais que estavam hipotensos, ou seja, os grupos LPS 6 h e CLP 48 h, demonstra uma redução do EDV mais significativa no grupo LPS 6 h. Ocorre que, ao compararmos os valores das frequências cardíacas destes dois grupos, antes e após a administração de dobutamina, podemos observar que o grupo LPS 6 h sempre apresentou uma elevada frequência cardíaca em relação ao grupo CLP, favorecendo um maior esvaziamento da câmara cardíaca em um intervalo de tempo. Isso pôde ser confirmado pela observação de um débito cardíaco do grupo LPS 6 h inferior ao do grupo CLP 48 h, após a administração de dobutamina. Entretanto, quando

comparamos os animais dos grupos LPS e CLP 24 h, observamos que o primeiro apresentou uma frequência cardíaca inferior ao segundo, antes e após a administração de dobutamina, não sofrendo por conseguinte alterações no EDV (Figura 28, B e D, representado pelos quadrados abertos). Além da reduzida frequência cardíaca em comparação ao grupo CLP 24 h, o grupo LPS 24 h também foi o único grupo que não apresentou aumento da fração de ejeção quando o coração foi estimulado com dobutamina (Figura 27 A e C, representado pelos quadrados abertos), sugerindo déficit contrátil nestes animais.

Finalmente, a análise comparativa da funcionalidade cardíaca entre os dois modelos indutores de choque cardiovascular por sepse, permitiu determinar a existência de uma evolução distinta do perfil cardiovascular, a qual decorre em parte devido à alterações discrepantes de expressão de proteínas relacionadas com o tráfego do íon cálcio no coração. Igualmente, o modelo de sepse, e as alterações de expressão das proteínas transportadoras do íon cálcio parecem influenciar respostas divergentes frente à administração da dobutamina, principal droga inotrópica positiva utilizada para o tratamento da MIS no ambiente hospitalar. Desconhecemos até o presente momento, trabalhos que tenham caracterizado a possível relação do modelo de sepse escolhido para análise cardíaca, acrescido das diferenças de expressão de proteínas transportadoras de cálcio de acordo com cada modelo, bem como o comportamento cardíaco frente a um desafio de estresse induzido por droga inotrópica positiva. Desta forma, acreditamos que esses resultados possam contribuir para a escolha e realização de futuros experimentos que almejem

esclarecer a fisiopatologia da disfunção cardíaca durante a sepse, a qual permanece ainda não totalmente elucidada.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo mostra, a partir do modelo de endotoxemia (LPS), a existência de diferenças na evolução da MIS de acordo com o gênero estudado. Evidenciamos que apenas os ratos machos desenvolveram déficit contrátil sustentado ventricular durante a sepse e que o mesmo está associado à expressões divergentes de proteínas cardíacas responsáveis pela cinética do íon cálcio entre os gêneros. Tais resultados sugerem a necessidade de uma reavaliação do tratamento do paciente séptico sob a ótica do gênero como provável fator independente para a evolução da MIS.

Conseguimos demonstrar também, que a administração de noradrenalina ou dobutamina para correção da hipotensão arterial induzida pela sepse (modelo de CLP), determinou respostas cardíacas distintas, sendo algumas delas potencialmente deletérias. Portanto, nossos resultados sugerem que o tratamento da hipotensão ocorre às custas de alterações funcionais cardíacas importantes, possivelmente negligenciadas, e as quais podem ter associação com a incapacidade destes fármacos de aumentar a sobrevida do paciente séptico. Experimentos adicionais, com a avaliação da função cardíaca durante ou após a administração contínua de agentes vasopressores e inotrópicos (por exemplo, através de infusão contínua), são necessários para um entendimento mais aprofundado desses efeitos.

Finalmente, demonstramos que os principais modelos para o estudo da MIS em ratos (LPS e CLP), induzem padrões de alterações cardíacas bastante distintos, tanto no que se refere a parâmetros basais, como com relação aos efeitos da dobutamina. Essas diferenças parecem decorrer, pelo menos

em parte, devido a alterações diferenciadas na expressão de proteínas responsáveis pelo tráfego do íon cálcio no coração. Considerando que ambos os modelos são amplamente utilizados para o estudo da MIS, nossos resultados permitem presumir que algumas inferências da literatura possam estar pautadas em resultados enviesados devido ao modelo de estudo proposto. Tal fato pode contribuir para a evidente falta de consenso acerca da evolução e características da MIS, bem como para a ainda reduzida qualidade de evidências científicas sobre os benefícios e potenciais riscos associados ao uso de fármacos para o seu tratamento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical care medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–10, jul. 2001.

ARLATI, S. et al. Myocardial necrosis in ICU patients with acute non-cardiac disease: a prospective study. **Intensive care medicine**, v. 26, n. 1, p. 31–7, jan. 2000.

BAAN, J. et al. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. **Circulation**, v. 70, n. 5, p. 812-23, 1984.

BAGSHAW, S. M. et al. Urine biochemistry in septic and non-septic acute kidney injury: a prospective observational study. **Journal of critical care**, v. 28, n. 4, p. 371-78, 2013.

BAI, X. et al. Early versus delayed administration of norepinephrine in patients with septic shock. **Critical care**, v. 18, n. 5, [*epud ahead of print*], oct. 2014.

BARNABY, D. et al. Heart rate variability in emergency department patients with sepsis. **Academic emergency medicine**, v. 9, n. 7, p. 661-70, 2002.

BERNARDIN, G. et al. Beta-adrenergic receptor-dependent and -independent stimulation of adenylate cyclase is impaired during severe sepsis in humans. **Intensive care medicine**, v. 24, n. 12, p. 1315-22, 1998.

BERNARDIN, G. et al. Impairment of β -adrenergic signaling in healthy peripheral blood mononuclear cells exposed to serum from patients with septic shock: involvement of the

inhibitory pathway of adenylyl cyclase stimulation. **Shock**, v. 19, n. 2, p. 108–12, 2003.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-55, jun. 1992.

BOUFERRACHE, K. et al. Initial resuscitation guided by the Surviving Sepsis Campaign recommendations and early echocardiographic assessment of hemodynamics in intensive care unit septic patients: A pilot study. **Critical care medicine**, v. 40, n. 10, p. 2821–27, ago. 2012.

BRADY, A. J. B.; POOLE-WILSON, P. A. Circulatory failure in septic shock: nitric oxide is too much of a good thing?. **British heart journal**, v. 70, p. 103–5, 1993.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ª edição. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2006. 1821 p.

BURAS, J. A; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 10, p. 854–65, out. 2005.

CASTOLDI, A. et al. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37584, jan. 2012.

CAVAZZONI, S. L. Z. et al. Ventricular dilation is associated with improved cardiovascular performance and survival in sepsis. **Chest**, v. 138, n. 4, p. 848-55, 2010.

CELES, M. R. N. et al. Reduction of gap and adherens junction proteins and intercalated disc structural remodeling in the hearts of mice submitted to severe cecal ligation and puncture sepsis. **Critical care medicine**, v. 35, n. 9, p. 2176-85, 2007.

CELES, M. R. N. et al. Increased sarcolemmal permeability as an early event in experimental septic cardiomyopathy: a potential role for oxidative damage to lipids and proteins. **Shock**, v. 33, n. 3, p. 322-31, 2010.

CELES, M. R. N.; PRADO, C. M.; ROSSI, M. A. Sepsis: going to the heart of the matter. **Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, v. 80, n. 2, p. 70–86, jan. 2013.

CHOPRA, M. et al. Norepinephrine induces systolic failure and inhibits antiapoptotic genes in a polymicrobial septic rat model. **Life sciences**, v. 87, p. 672-78, 2010.

CHOPRA, M.; DAS, P.; SHARMA, A. C. Caspase-3 knock-down reverses contractile dysfunction induced by sepsis in adult rat ventricular myocytes. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 1, p. 93–100, may. 2010.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 885–91, dec. 2002.

CROFT, C. B. et al. Sepsis and burn complicated by sepsis alter cardiac transporter expression. **Burns**, v. 33, p. 72-80, 2007.

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**, v. 17, n. 1, p. 70-6, 2002.

DE AZEVEDO, J. R. et al. Prognostic evaluation of severe sepsis and septic shock: Procalcitonin clearance vs Δ sequential organ failure assessment. **Journal of critical care**, v. 14, [*Epub ahead to print*], sep. 2014.

DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?. **The cell - trends in microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, apr. 2011.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Critical care medicine**, v. 36, n. 1, p. 296–327, 2008.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012. **Intensive care medicine**, jan. 2013.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, v. 112, n. 6 Suppl, p. 321S–329S, dez. 1997.

DONG, L. W.; WU, L. L.; LIU, M. S. Impairment of the ryanodine-sensitive calcium release channels in the cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanisms during the hypodynamic phase of sepsis. **Shock**, v. 16, n. 1, p. 33-9, 2001.

FENELEY, M. P. et al. Comparison of preload recruitable stroke work, end-systolic pressure-volume and dP/dT_{max}–end-diastolic volume relations as indexes of left-ventricular contractile performance in patients undergoing routine cardiac-

catheterization. **Journal of the american college of cardiology**, v. 19, n. 7, p. 1522-30, 1992.

FLIERL, M. A. et al. Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 14, n. 5-6, p. 327-36, 2007.

FLYNN, A.; CHOKKALINGAM MANI, B.; MATHER, P. J. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. **Heart failure reviews**, v. 15, n. 6, p. 605-11, nov. 2010.

GLOWER, D. D. et al. Linearity of the Frank-Starling relationship in the intact heart: the concept of preload recruitable stroke work. **Circulation**, v. 71, n. 5, p. 994-1009, 1985.

GRANGER, D. L. et al. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. **The journal of clinical investigation**, v. 85, n. 1, p. 264-73, jan. 1990.

HERNANDEZ, G. et al. Management of septic shock with a norepinephrine-based haemodynamic algorithm. **Resuscitation**. v. 66, p. 63-69, 2005.

HOBAL, I. A. et al. SERCA Cys674 sulphonylation and inhibition of L-type Ca²⁺ influx contribute to cardiac dysfunction in endotoxemic mice, independent of cGMP synthesis. **American journal of physiology: heart and circulatory physiology**, v. 305, n. 8, p. H1189-200, out. 2013.

HORTON, J. W.; WHITE, D. J.; MAASS, D. L. Gender-related differences in myocardial inflammatory and contractile responses to major burn trauma. **American journal of**

physiology: heart and circulatory physiology, v. 286, n. 1, p. H202-13, 2004.

HUBACEK, J. A. et al. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. **Critical care medicine**, v. 29, n. 3, p. 557–61, mar. 2001.

HUBBARD, W. L. et al. Cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 24, Suppl. 1, p. 52-57, 2005.

HUNTER, J. D.; DODDI, M. Sepsis and the heart. **British journal of anaesthesia**, v. 104, n. 1, p. 3–11, jan. 2010.

INOUE, S. et al. Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. **Critical care medicine**, v. 41, n. 3, p. 810-9, mar. 2013.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. Campanha sobrevivendo à sepse: Relatório Nacional. Disponível em: www.sepsisnet.org. Acesso em: 03 de set. 2014.

JELLEMA, W. T. et al. Heterogeneity and prediction of hemodynamic responses to dobutamine in patients with septic shock. **Critical care medicine**, v. 34, n. 9, p. 2392-98, 2006.

JIAO, G. Y. et al. Reduced DHPR α 1S and RyR1 expression levels are associated with diaphragm contractile dysfunction during sepsis. **Muscle nerve**, v. 48, n. 5, p. 745-51, 2013.

KASS, D. A. et al. Influence of contractile state on curvilinearity of in situ end-systolic pressure-volume relations. **Circulation**, v. 79, n. 1, p. 167-78, 1989.

KHO, C. et al. SUMO1-dependent modulation of SERCA2a in heart failure. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 601–5, 29 set. 2011.

KUMAR, G. et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000–2007). **Chest**, v. 140, n. 5, p. 1223–31, nov. 2011.

KUSHIMOTO, S. et al. The impact of body temperature abnormalities on the disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis. **Critical care**, v. 17, n. 6, p. 1–9, 2013.

LANDESBURG, G. et al. Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 895–903, abr. 2012.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical care medicine**, v. 31, n. 4, p. 1250–6, abr. 2003.

LIONETTI, V. et al. Impact of acute changes of left ventricular contractility on the transvalvular impedance: validation study by pressure-volume loop analysis in healthy pigs. **PloS one**, v. 19, n. 8, p. e80591, nov. 2013.

LITTLE, W. C. et al. The left ventricular dP/dtmax–end-diastolic volume relation in closed-chest dogs. **Circulation research**, v. 56, n. 6, p. 808–15, 1985.

LODHA, R. et al. Myocardial cell injury is common in children with septic shock. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 98, n. 3, p. 478–81, mar. 2009.

MAHJOUR, Y. et al. Improvement of left ventricular relaxation as assessed by tissue Doppler imaging in fluid-responsive critically ill septic patients. **Intensive care medicine**, v. 38, n. 9, p. 1461–70, set. 2012.

MARTIN, C. et al. Effects of norepinephrine plus dobutamine or norepinephrine alone on left ventricular performance os septic shock patients. **Critical care medicine**, v. 27, n. 9, p. 1708-13, sep. 1999.

MARX, S. O. et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. **Cell**, v. 101, n. 4, p. 365–76, may. 2000.

MATSUDA, N. et al. Impairment of cardiac beta-adrenoceptor cellular signaling by decreased expression of G(s alpha) in septic rabbits. **Anesthesiology**, v. 93, n. 6, p. 1465-73, 2000.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4-11, jan. 2014.

MERX, M. W.; WEBER, C. Sepsis and the heart. **Circulation**, v. 116, n. 7, p. 793–802, ago. 2007.

MILLER, S. I. et al. Hypoglycemia as a manifestation of sepsis. **American journal of medicine**, v. 68, n. 5, p. 649-54, 1980.

MITAKA, C. et al. Relationships of circulating nitrite/nitrate levels to severity and multiple organ dysfunction syndrome in systemic inflammatory response syndrome. **Shock**, v. 19, n. 4, p. 305-09, 2003.

MOSCA, L. Aspirin chemoprevention: one size does not fit all. **Circulation**, v. 117, n. 22, p. 2844–6, jun. 2008.

MOSCA, L. et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women--2011 update: a guideline from the american heart association. **Circulation**, v. 123, n. 11, p. 1243–62, mar. 2011.

MULLER-WERDAN, U. et al. Septic cardiomyopathy – A not yet discovered cardiomyopathy?. **Clinical cardiology**, v. 11, n. 3, p. 226-36, 2006.

NDUKA, O. O.; PARRILLO, J. E. The pathophysiology of septic shock. **Critical care clinics**, v. 25, n. 4, p. 677–702, vii, out. 2009.

OSTROWSKI, S. R. et al. Coagulopathy, catecholamines, and biomarkers of endothelial damage in experimental human endotoxemia and in patients with severe sepsis: a prospective study. **Journal of critical care**, v. 28, n. 5, p. 586-96, 2013.

PACHER, P. et al. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. **Nature protocols**, v. 3, n. 9, p. 1422–34, jan. 2008.

PARKER, M. M. et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. **Annals of internal medicine**, v. 100, n. 4, p. 483-90, 1984.

PARRILLO, J. E. et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Annals of internal medicine**, v. 113, n. 3, p. 227–42, ago. 1990.

PENG, T. et al. Disruption of phospholipase C γ signalling attenuates cardiac tumor necrosis factor- α expression and improves myocardial function during endotoxemia. **Cardiovascular research**, v. 78, p. 90-97, 2008.

PIPER, R. D. et al. Structure-function relationships in the septic rat heart. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 156, p. 1473-82, 1997.

POELAERT, J. et al. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. **Intensive care medicine**, v. 23, n. 5, p. 553-60, may. 1997.

POTT, C.; GOLDBERGER, J. I. Is the ryanodine receptor a target for antiarrhythmic therapy? **Circulation research**, v. 98, n. 10, p. 1232-3, may. 2006.

QUINONES, M. A.; GAASCH, W. H.; ALEXANDER, J. K. Influence of acute changes in preload, afterload, contractile state and heart rate on ejection and isovolumic indices of myocardial contractility in man. **Circulation**, v. 53, n. 2, p. 293-302, 1976.

RABUEL, C.; MEBAZAA, A. Septic shock: a heart story since the 1960s. **Intensive care medicine**, v. 32, p. 799-807, 2006.

REMICK, D. G.; WARD, P. A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. **Shock**, v. 24, suppl. 1, p. 7-11, 2005.

RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 31-6, dez. 2009.

ROMERO-BERMEJO, F. J. et al. Sepsis-induced cardiomyopathy. **Current cardiology reviews**, v. 7, n. 3, p. 163–83, ago. 2011.

ROSSI, M. A et al. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. **Shock**, v. 27, n. 1, p. 10–8, jan. 2007.

RUDIGER, A.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. **Critical care medicine**, v. 35, n. 6, p. 1599–608, jun. 2007.

SAKR, Y. et al. Does dopamine administration in shock influence outcome? Results of the Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients (SOAP) Study. **Critical care medicine**, v. 34, n. 3, p. 589–97, mar. 2006.

SARAIVA, R. M.; HARE, J. M. Nitric oxide signaling in the cardiovascular system: implications for heart failure. **Current opinion in cardiology**, v.21, p.221-28, 2006.

SCHMITTINGER, C. A. et al. Adverse cardiac events during catecholamine vasopressor therapy: a prospective observational study. **Intensive care medicine**, v. 38, n. 6, p. 950-8, jun. 2012.

SCHMITTINGER, C. A. et al. Histologic pathologies of the myocardium in septic shock: a prospective observational study. **Shock**, v. 39, n. 4, p. 329-35, 2013.

SCHRÖDER, J. et al. Gender differences in human sepsis. **Archives of surgery**, v. 133, n. 11, p. 1200–5, nov. 1998.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical care (London, England)**, v. 8, n. 4, p. R251–60, ago. 2004.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, Issue 1, p. 76-85, oct. 1985.

STARLING, M. R. et al. Load independence of the rate of isovolumic relaxation in man. **Circulation**, v. 76, n. 6, p. 1274-81, 1987.

STEENDIJK, P. et al. Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for a dual-field conductance catheter. **American journal of physiology: heart and circulatory physiology**, v. 281, p. H755-63, 2001.

STENGL, M. et al. Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from pigs with hyperdynamic septic shock. **Critical care medicine**, v. 38, n. 2, p. 579–87, fev. 2010.

TAO, W. et al. Hemodynamic and cardiac contractile function during sepsis caused by cecal ligation and puncture in mice. **Shock**, v. 21, n. 1, p. 31-37, 2004.

TELES, J. M. M. et al. Surviving sepsis campaign in Brazil. **Shock**, v. 30 Suppl 1, p. 47–52, out. 2008.

TSUSHIMA, K. et al. Acute lung injury review. **Internal medicine**, v. 48, p. 621-30, 2009.

VAN DER POLL, T.; OPAL, S. M. Host-pathogen interactions in sepsis. **The lancet infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. 32–43, jan. 2008.

VASU, T. S. et al. Norepinephrine or dopamine for septic shock: systematic review of randomized clinical trials. **Journal of intensive care medicine**. V. 27, n. 3, p. 172-8, may-jun. 2012.

VIEILLARD-BARON, A. et al. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. **Critical care medicine**, v. 36, n. 6, p. 1701-06, 2008.

VINCENT, J.-L. et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study*. **Critical care medicine**, v. 34, n. 2, p. 344–353, fev. 2006.

WEIXELBAUMER, K. M. et al. Estrus cycle status defined by vaginal cytology does not correspond to fluctuations of circulating estrogens in female mice. **Shock**, v. 41, n. 2, p. 145-53, 2014.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock-A review of laboratory models and a proposal. **Journal of surgical research**, v. 29, p. 189-201, 1980.

WU, L. -L.; LIU, M. S. Altered ryanodine receptor of canine cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism in endotoxin shock. **Journal of surgical research**, v. 53, n. 1, p. 82-90, jul. 1992.

WU, L.-L. et al. Altered phospholamban-calcium ATPase interaction in cardiac sarcoplasmic reticulum during the progression of sepsis. **Shock**, v. 17, n. 5, p. 389–93, may. 2002.

YANG, S. et al. Pentoxifylline prevents the transition from the hyperdynamic to hypodynamic response during sepsis.

American journal of physiology: heart and circulatory physiology, v. 277, n. 3, p. H1036-44, sep. 1999.

YIN, G. Q. et al. Effect of fluid resuscitation on ryanodine receptor in macaques with endotoxic shock. **Resuscitation**, v. 70, n. 1, p. 145-52, jul. 2006.

ZAUSIG, Y. A. et al. Direct cardiac effects of dobutamine, dopamine, epinephrine, and levosimendan in isolated septic rat hearts. **Shock**, v. 34, n. 3, p. 269–74, set. 2010.

ZAKY, A. et al. Characterization of cardiac dysfunction in sepsis: an ongoing challenge. **Shock**, v. 41, n. 1, p. 12-24, 2014.

ZHONG, J. et al. Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from endotoxemic guinea pigs. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 5 Pt 2, p. H2312–24, nov. 1997.

ZHOU, M. et al. Cardiac contractility and structure are not significantly compromised even during the late hypodynamic stage of sepsis. **Shock**, v. 9, n. 5, p.352-58, 1998.

8 APÊNDICE

8.1 ÁREA SOB A CURVA DO EFEITO HIPERTENSOR DA FENILEFRINA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS COM ENDOTOXEMIA

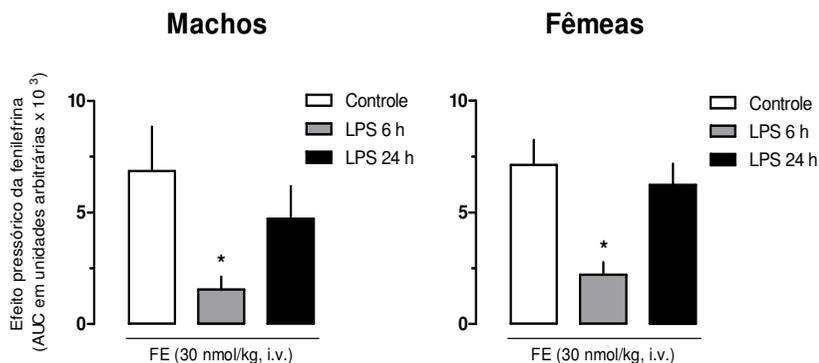


Figura 33: Hiporresponsividade a administração de fenilefrina em ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Fenilefrina foi administrada em dose única (30 nmol/kg) por via intravenosa em ratos machos e fêmeas tratados com LPS (10 mg/kg, i.p) 6 e 24 horas antes. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 a 8 animais por grupo. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle. FE: fenilefrina.

8.2 CURVA CONCENTRAÇÃO RESPOSTA PARA FENILEFRINA EM ANÉIS DE AORTA ISOLADA DE RATOS MACHOS E FÊMEAS COM ENDOTOXEMIA

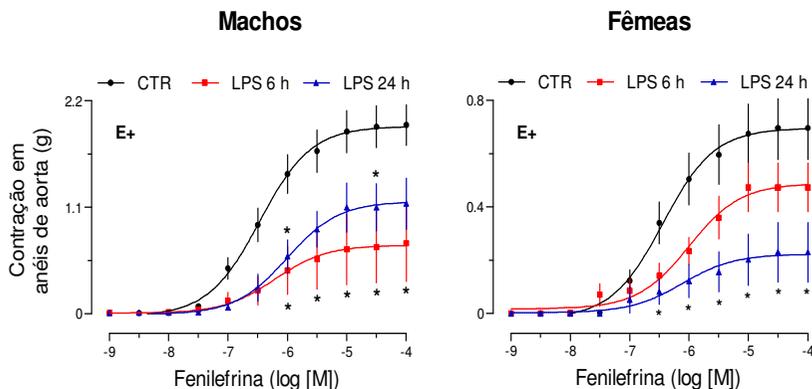


Figura 34: Hiporresponsividade à fenilefrina em anéis de aorta de ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Avaliação da resposta (em gramas de contração) de anéis de aorta após a administração de concentrações crescentes (1 nM a 0,1 mM) de fenilefrina em ratos machos e fêmeas tratados com LPS (10 mg/kg, i.p) 6 e 24 horas antes. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 a 8 animais por grupo. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle. Protocolo experimental de acordo com da Silva-Santos, (2002).

8.3 PESO ÚMIDO E PESO SECO DO PULMÃO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS COM ENDOTOXEMIA

Para a avaliação da relação peso úmido/peso seco pulmonar, os animais foram anestesiados conforme descrito no

item 3.4. Posteriormente, uma esternectomia total foi realizada seguida pela pneumonectomia do pulmão esquerdo dos animais. O pulmão retirado foi seco superficialmente em papel e pesado (SHIMADZU[®], AY220; Taguig City, Filipinas), seguido por acondicionamento em estufa com temperatura controlada de 37°C para desidratação (DeLeo, TLK 48, Porto Alegre, Brasil) por um período de 24 horas e nova pesagem. Os resultados encontrados de peso úmido e seco do pulmão foram divididos pelo peso corporal do respectivo animal.

Tabela 9: Avaliação do peso úmido e peso seco do pulmão de ratos machos e fêmeas com endotoxemia.

	<i>Machos</i>	<i>Fêmeas</i>
<i>Peso úmido/massa corporal</i>		
<i>(mg/g)</i>		
<i>Controle</i>	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0
<i>LPS 6 h</i>	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1
<i>LPS 24 h</i>	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0
<i>Peso seco/massa corporal</i>		
<i>(mg/g)</i>		
<i>Controle</i>	0,4 ± 0	0,3 ± 0
<i>LPS 6 h</i>	0,4 ± 0	0,4 ± 0
<i>LPS 24 h</i>	0,4 ± 0	0,4 ± 0

A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls (P < 0,05).

8.4 DIFERENÇAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CARDÍACAS RESPONSÁVEIS PELO TRÁFEGO DO ÍON CÁLCIO ENTRE RATOS MACHOS E FÊMEAS COM ENDOTOXEMIA

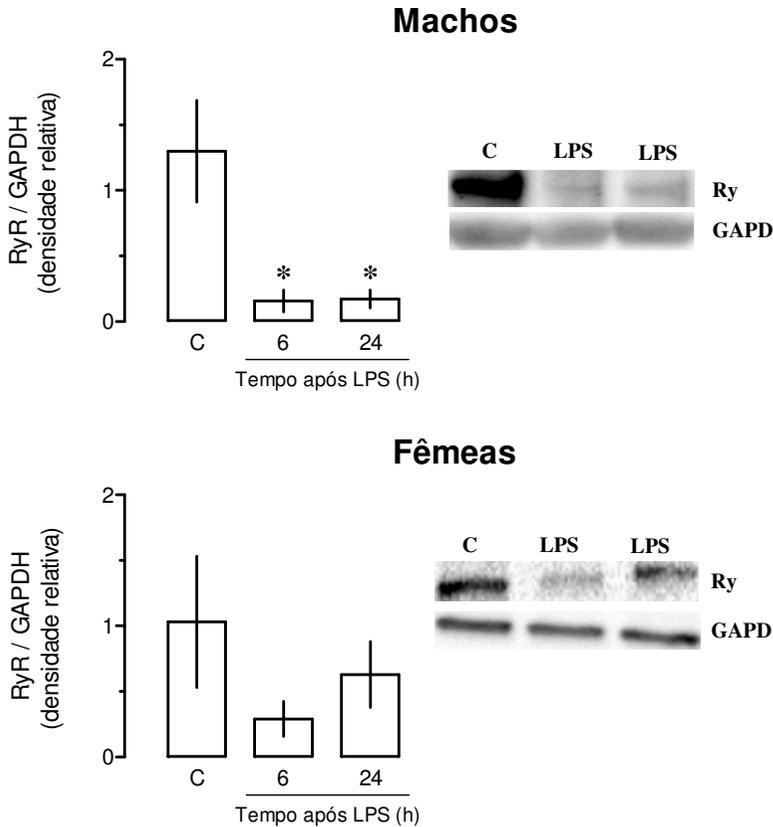


Figura 35: Expressão do receptor de rianodina em corações de ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados mostrados representam a média \pm EPM de 3 a 4 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida

peelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

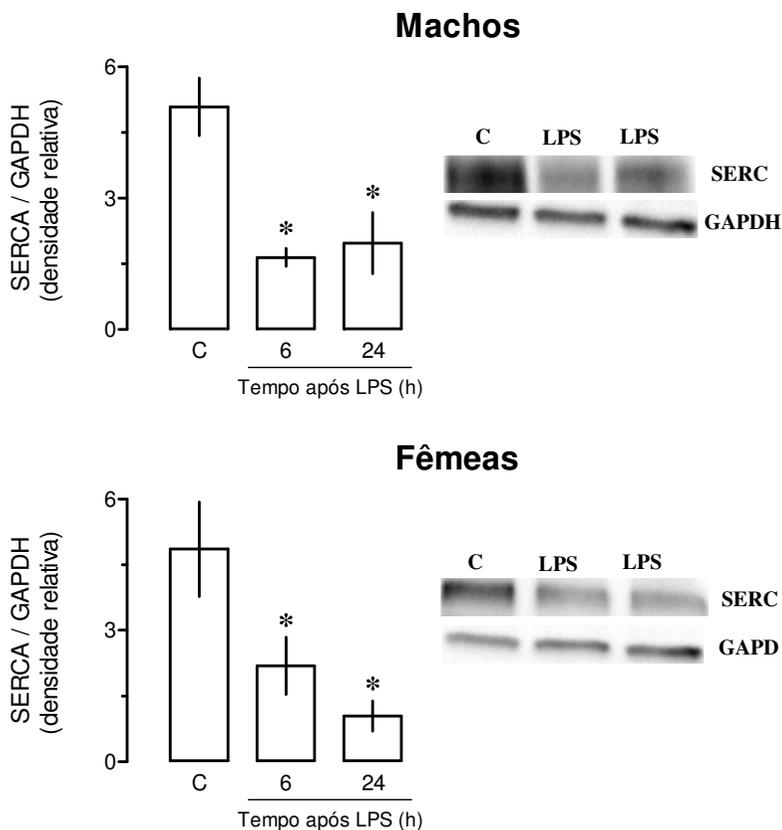


Figura 36: Expressão da SERCA em corações de ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados mostrados representam a média \pm EPM de 3 a 4 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo

teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

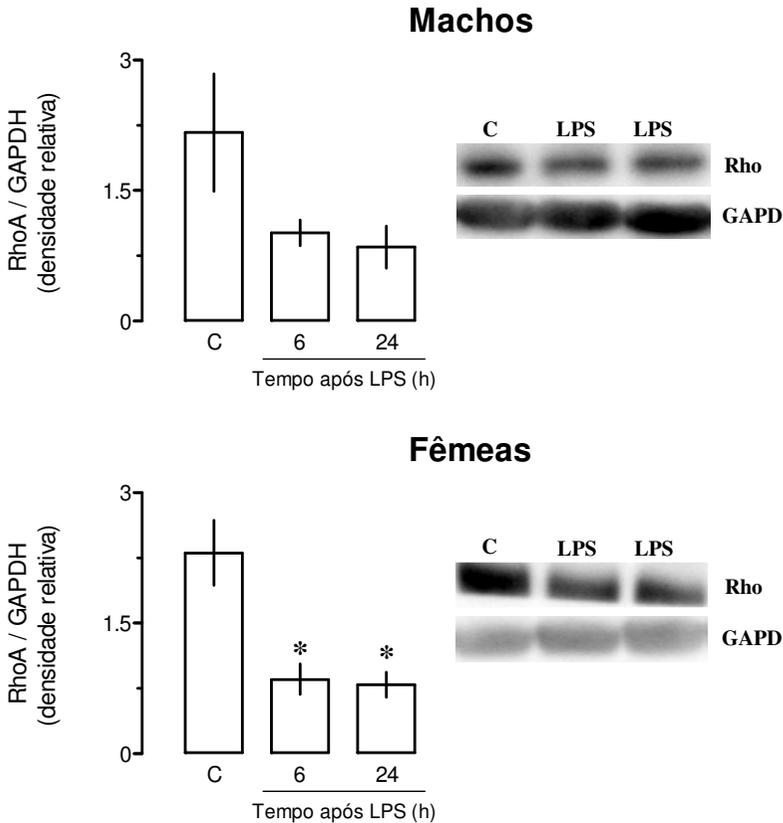


Figura 37: Expressão de RhoA em corações de ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados mostrados representam a média \pm EPM de 3 a 4 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

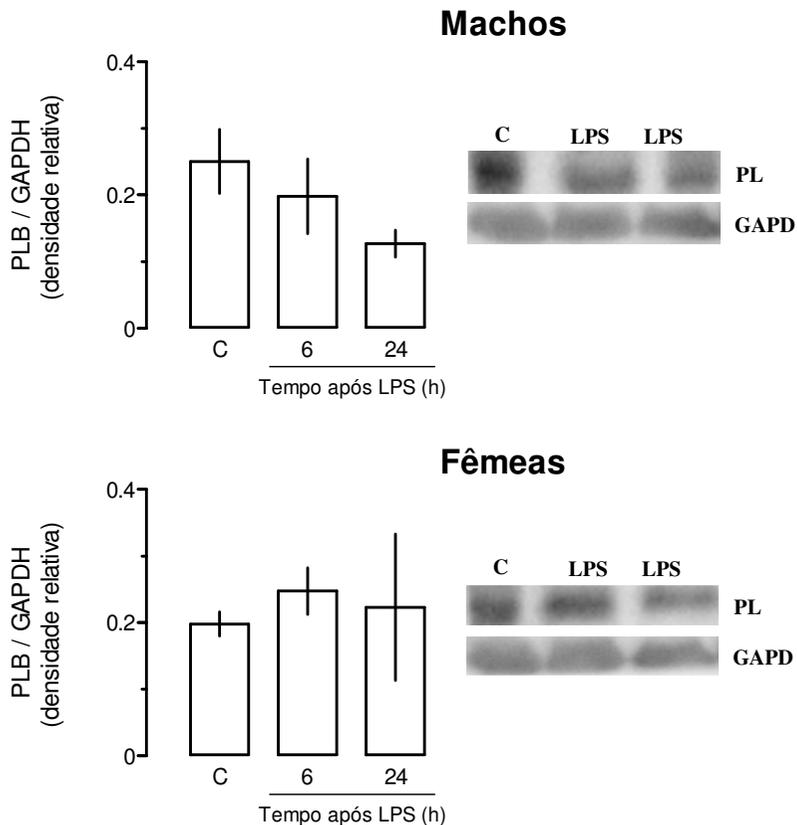


Figura 38: Expressão de fosfolambana (PLB) em corações de ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados mostrados representam a média \pm EPM de 3 a 4 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

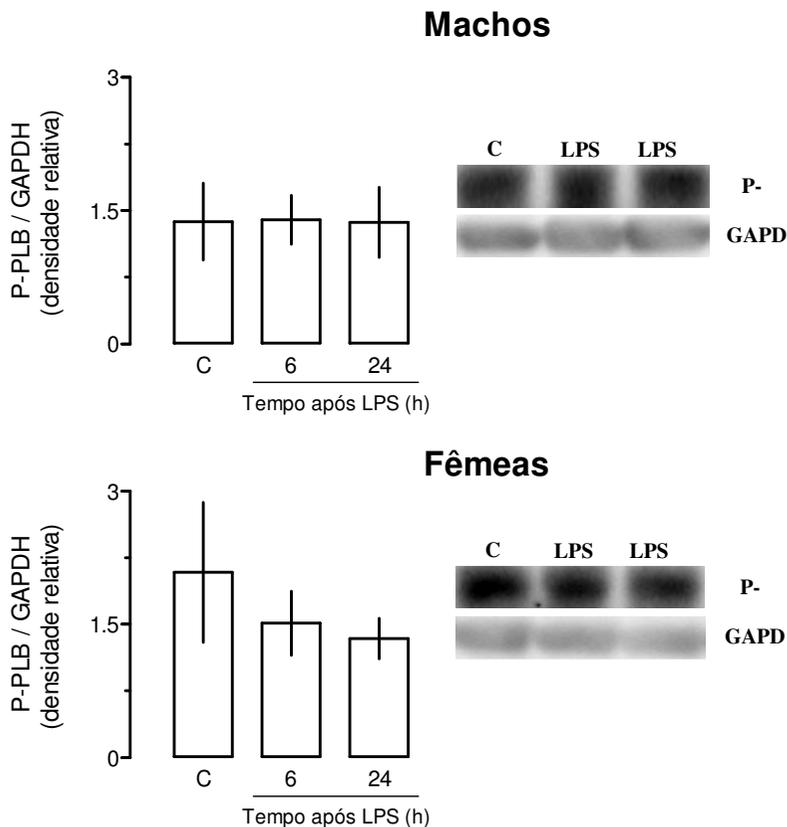


Figura 39: Expressão da forma fosforilada da proteína fosfolambana (P-PLB) em corações de ratos machos e fêmeas com endotoxemia. Os resultados mostrados representam a média \pm EPM de 3 a 4 animais por grupo. A letra “C” indica os resultados do grupo controle. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * indica $P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controle.

8.5 ARTIGO PUBLICADO

Shock, 2014, Jul 4 (Epub ahead of print); PMID: 25004065

Gender-Specific Differences in the in situ Cardiac Function of Endotoxemic Rats Detected by Pressure-Volume Catheter.

Gonçalves RP, Guarido KL, Assreuy J, da Silva-Santos JE.

Abstract

The aim of the present study was to investigate the existence of gender-related differences in the profile of changes that occur in cardiac functionality during endotoxic shock. For this, both male and female Wistar rats received a single injection of lipopolysaccharide (LPS; 10 mg/kg, i.p.) at 6 h (LPS 6 h group) or 24 h (LPS 24 h group) before the induction of anesthesia and insertion of a pressure-volume catheter using the closed-chest method. Control animals received sterile saline. Hemodynamic parameters were recorded under basal conditions and during the peak of the pressor effect of phenylephrine (30 nmol/kg i.v.). Body temperature, hematological parameters, blood glucose, and diuresis were also evaluated. There were unremarkable differences between male and female rats in the general aspects of sepsis evaluated in our study. Both male and female rats from the LPS 6 h group presented hypotension, depressed left ventricular ejection fraction, decreased stroke work, reduced dP/dt_{max} , $P@dP/dt_{max}$, dP/dt_{min} , and PRSW indices, as well as increased end-systolic volume. Nevertheless, only male rats from the LPS 24 h group still presented decreased stroke work, and reduced dP/dt_{max} , $P@dP/dt_{max}$, and PRSW indices. The end-systolic volume presented slight changes during the pressor

effects of phenylephrine in all groups of male rats, as well as in females from the control and LPS 6 h groups, but it was significantly increased in females from the LPS 24 h group. These findings suggest that after induction of endotoxic shock female rats may recover the inotropic cardiac function earlier than males, as well as present improved adaptation of their left ventricle to the pressure loading effects of phenylephrine.

http://journals.lww.com/shockjournal/Abstract/publishahead/Gender_Specific_Differences_in_the_in_situ_Cardiac.98661.aspx